

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Freiburg im Breisgau
Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c. O. Westphal

**LIPID-PROTEINWECHSELWIRKUNGEN
IN PLASMAMEMBRANEN VON THYMOZYTEN**
Einfluß der Lipidstruktur auf membrangebundene ATP'asen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.

vorgelegt von
Cornelius Anders
aus Lahr/Baden

1980

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Freiburg im Breisgau
Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c. O. Westphal

**LIPID-PROTEINWECHSELWIRKUNGEN
IN PLASMAMEMBRANEN VON THYMOZYTEN**
Einfluß der Lipidstruktur auf membrangebundene ATP'asen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.

vorgelegt von
Cornelius Anders
aus Lahr/Baden

1980

Dekan:

Prof. Dr. G. Feix

Leiter der Arbeit:

Priv.Do. Dr. E. Ferber

Referent:

Prof. Dr. Dr. h.c. O. Westphal

Korreferent:

Promotionsdatum:



Ich danke

- Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Otto Westphal für den Arbeitsplatz am Max-Planck-Institut für Immunbiologie sowie für die Übernahme des Referats.
- Herrn Priv. Doz. Dr. Ernst Ferber, unter dessen Leitung diese Arbeit durchgeführt wurde, für die anregenden Diskussionen und die hilfsbereite Betreuung.
- Herrn Dr. Ulrich Weltzien für die wertvollen Anregungen.
- Den Dozenten der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. für die Betreuung während des Aufbau-Studiums.
- Frau Kathy Hansen für die Präparation der Thymozytenplasmamembranen.
- Frau Ingrid Aehnelt für die technische Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.
- Frau Renate Binder und Frau Helga Kuttler für die Hilfe bei der Anfertigung des Manuskripts.
- den Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie für die Hilfsbereitschaft und Freundschaft, die mir entgegengebracht wurde.
- der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften für die finanzielle Unterstützung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545304_0015

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Bedeutung von Lipiden für die Regulation von Enzymaktivitäten in biologischen Membranen	1
1.2 Frühe Ereignisse bei der Stimulation von Lymphozyten	6
1.3 Einfluß von plasmamembrangebundenen Fettsäuren auf die Immunantwort	10
2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT	16
3. METHODEN	19
3.1 Gewinnung von Plasmamembranen aus Kalbsthymozyten	19
3.1.1 Präparation der Zellsuspension (Brunner et al., 1978)	19
3.1.2 Zellaufschluß und Membranpräparation	19
3.2 Biochemische Bestimmungen	21
3.2.1 Proteinbestimmung mit Ninhydrin	21
3.2.2 Analyse der Membranlipide	22
3.2.3 Bestimmung der Mg^{2+} -Adenosintriphosphatase; Mg^{2+} -ATPase	26
3.2.4 Bestimmung der Na^+ , K^+ -Adenosintriphosphatase Na^+ , K^+ -ATPase	27
3.2.5 Bestimmung der Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholin- acyltransferase	28
3.2.6 Bestimmung der γ -Glutamyltransferase (γ -GT)	30
3.2.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase	31
3.3 Bestimmung der Fluidität von Thymozytenplasma- membranen durch Fluoreszenzpolarisation	32

3.3.2	Praktische Durchführung der Fluoreszenz-polarisationsbestimmung	35
4.	ERGEBNISSE	38
4.1	Einfluß von Lysophosphatidylcholin und acyliertem Lysophosphatidylcholin auf die Mg^{2+} -ATPase von Kalbs-thymozytenplasmamembranen	38
4.1.1	Wirkung hoher Lysophosphatidylcholkonzentrationen auf die Solubilisierung von Thymozytenplasmamembranen	38
4.1.2	Verteilung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyl-transferase und Mg^{2+} -ATPase auf Sediment und Überstand nach Inkubation mit Lysophosphatidylcholin	39
4.1.3	Acylierung von exogen zugegebenem Lysophosphatidylcholin	42
4.4.1	Optimale Acylierung von exogenem Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen	45
4.1.2	Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase von Phospholipase A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen	49
4.2.2	Bestimmung der Fluidität von Thymozytenplasmamembranen nach Behandlung mit Phospholipase A_2	52
4.2.3	Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase von Phospholipase A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen nach Inkubation mit Rinderserumalbumin	52
4.3	Umacylierung der Membranphospholipide in einem Reaktionsschritt	59
4.3.1	Acylierung von endogen gebildetem Lysophosphatidylcholin nach Inkubation mit Phospholipase A_2	59
4.3.2	Bestimmung der Einbaurate von Arachidonsäure in endogen gebildetes Lysophosphatidylcholin	60

4.3.3	Spezifität der Phospholipase A_2 gegenüber Phospholipiden in der Thymozytenplasmamembran	63
4.4	Umacylierung der Membranphospholipide in zwei Reaktionsschritten	64
4.4.1	Reacylierung von Lysophospholipiden mit Arachidonoyl-CoA	66
4.4.2	Einfluß der Reacylierung der Lysophospholipide mit Arachidonoyl-CoA auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase	72
4.4.3	Einbau verschiedener Fettsäuren in Phospholipase A_2 behandelte Thymozytenplasmamembranen	77
4.4.4	Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase durch Erhöhung des Cholesteringehalts des Thymozytenplasmamembranen	82
4.5	Aktivierung der Na^+, K^+ -ATPase in Kalbsthymozyten- plasmamembranen durch Einbau von Arachidonsäure	83
4.5.1	Versuchsführung zur Aktivierung der Na^+, K^+ -ATPase	84
4.5.2	Einbau von Fettsäuren in native Thymozyten- plasmamembranen	86
4.5.3	Vergleich der Mikroviskosität von Thymozytenplasma- membranen nach Acylierung mit Arachidonoyl-CoA und Oleoyl-CoA	87
4.5.4	Untersuchung zur Reversibilität der Na^+, K^+ - ATPase-Aktivierung	89
4.6	Hydrolyse von Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen	93
4.6.1	Metabolismus von Lysophosphatidylcholin in Thymozyten- plasmamembranen	94
4.6.2	Spezifität der Lysophospholipase gegenüber radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin	96

4.6.3	Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von Lyso-phosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen von der Substratkonzentration	97
4.6.4	Abbau von membrangebundenem Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin durch Zugabe von Glycerophosphorylcholin	101
5.	DISKUSSION	108
5.1	Einfluß der Phospholipide auf Enzymaktivitäten in Thymozytenplasmamembranen	108
5.1.1	Einfluß von exogen zugegebenem Lipid auf die Mg^{2+} -ATP'ase	110
5.1.2	Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATP'ase nach Inkubation mit Phospholipase A_2 und Rinderserumalbumin	111
5.1.3	Rekonstitution der mit Phospholipase A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen mit Acyl-CoA	113
5.1.4	Einfluß verschiedener Fettsäuren auf die Mg^{2+} -ATP'ase von Thymozytenplasmamembranen	115
5.2	Bedeutung der Fluidität auf die plasmamembrangebundene Mg^{2+} -ATP'ase aus Kalbthymozyten	118
5.2.1	Abhängigkeit der Fluidität von Thymozytenplasmamembranen vom Acylierungsgrad der Phospholipide	119
5.3	Wirkung der Arachidonsäure auf die Na^+, K^+ -ATP'ase der Thymozytenplasmamembran	122
5.3.1	Aktivierung der Na^+, K^+ -ATP'ase in nativen Thymozytenplasmamembranen nach Einbau von Arachidonsäure	125
5.3.2	Die Bedeutung der Na^+, K^+ -ATP'ase für die Lymphozytenstimulation	128
5.4	Deacylierung von Phospholipiden beim Austausch von Fettsäuren in Thymozytenplasmamembranen	130

6.	ZUSAMMENFASSUNG	141
7.	MATERIAL UND GERÄTE	146
8.	ABKÜRZUNGEN	148
	LITERATUR	149

1. EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung von Lipiden für die Regulation von Enzym-Aktivitäten in biologischen Membranen

Die meisten biologischen Membranen enthalten ungefähr 40% Lipide und 60% Protein. Diese Werte schwanken jedoch beträchtlich. Die innere Mitochondrienmembran enthält einen Lipidanteil von nur 20%-25%; die Myelinmembran dagegen bis zu 75%. Die Membranlipide sind polar und zeigen eine charakteristische Zusammensetzung. Diese wird von der Herkunft der Membran bestimmt. Phospholipide stellen den grössten Anteil unter den Membranlipiden, gefolgt von Sphingolipiden und Cholesterin. Plasmamembranen von höheren Zellen enthalten einen hohen Anteil an freiem oder verestertem Cholesterin. Das Verhältnis der verschiedenen Membranlipide zueinander ist charakteristisch für den Membrantyp, die Zelle und die Spezies. Es lässt sich durch die äussere Zufuhr von Lipiden über die Nahrung kaum verändern. Nur die Zusammensetzung der Lipidfettsäuren lässt sich durch äussere Bedingungen beeinflussen.

Die Gründe, die für die grosse Vielfalt von Lipiden in biologischen Membranen verantwortlich sind, lassen sich auch heute noch nicht vollständig darstellen. In dem von Singer und Nicolson (1972) beschriebenen Modell des Aufbaus von biologischen Membranen wird Lipiden eine wichtige Aufgabe für die Membranstruktur zugewiesen. Dabei muss aber berücksichtigt werden, daß auch eine einzige Spezies der Phospholipide, z.B. Phosphatidylcholin, diese Strukturaufgabe gut erfüllen könnte. In den verschiedenen Membranen von Säugetierzellen finden sich aber mehr als 100 verschiedene Lipide. Daraus ergibt sich die Vermutung, daß außer der Aufgabe, der Zellmembran eine Struktur zu verleihen, noch andere Funktionen der Lipide von Bedeutung sein müssen.

Das von Singer und Nicolson entwickelte Modell ("fluid mosaic model") beschreibt eine freie Beweglichkeit der verschiedenen Membrankomponenten in der Membranebene. Diese Beweglichkeit wird durch die Fluidität der Lipidphase ermöglicht. Das frei bewegliche System der Membranlipide wird durch integrale oder periphere Proteine unterbrochen. Diese können entweder nur von einer Seite in die Lipiddoppelschicht eindringen oder aber auch durch die ganze Membran hindurchreichen.

Die Vielfalt der Lipide läßt sich teilweise dadurch erklären, daß sich die biologische Funktion dieser integralen und peripheren Proteine sich durch Änderung der Fluidität der Lipidmatrix regulieren läßt. Durch Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran kann dann bei veränderten Bedürfnissen der Zelle die biologische Funktion der Proteine auf diese Bedürfnisse abgestimmt werden. Dies entspricht dem in der Chemie allgemein gültigen Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion. Der Strukturparameter ist dabei die Lipidschicht, der Funktionsparameter die Aktivität der Proteine in dieser Lipidschicht. Neben dem allgemeinen Einfluss der Fluidität auf die Membran können auch spezifische Wechselwirkungen von Lipiden mit Proteinen für die biologische Aktivität dieser Proteine von Bedeutung sein.

Die größte Änderung in den Eigenschaften der Lipidstruktur erfolgt beim Übergang vom gelartig-festen zum flüssig-kristallinen Zustand. Dieser Übergang ist mit einer Änderung der freien Beweglichkeit der hydrophoben Acylgruppen der Lipide um die C-C Bindungsachse verbunden. Der Übergang verläuft unter kooperativen Bedingungen. Wird an einer Stelle das System fluider, so wird eine angrenzende Position darin unterstützt, auch in einen fluideren Zustand überzugehen. Dies trifft aber nicht auf die Lipide in der Lipid-Proteingrenzschicht zu. Hier treten Lipid-Protein-

wechselwirkungen in Konkurrenz zu Lipid-Lipidwechselwirkungen. Dabei geht der kooperative Effekt der Lipide auf die Fluiditätsänderung verloren (Lee, 1977).

Die im Vergleich zu den frei beweglichen Lipiden aus physikalischer Sicht unterschiedliche Position der Grenzsichtlipide gab diesen die Bezeichnung "annuläre Lipide". Bei niedriger Temperatur befinden sich die Fettsäuren der annulären Lipide in einer all-trans Konfiguration. Dies ergibt eine hohe Enthalpie für die Wechselwirkung zwischen den Lipiden und den Proteinen. Andererseits ist durch die verhinderte Beweglichkeit der Lipide die Entropie stark erniedrigt. Diese erhält bei erhöhter Temperatur eine größere Bedeutung als die Enthalpie (Temperaturabhängigkeit des Entropieterms). Dadurch lösen sich die Lipide bei Erhöhung der Temperatur vom Protein.

Für die (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel wurde gezeigt, daß 35 Lipidmoleküle für jedes ATPase-Molekül genügen, um die Enzymaktivität zu erhalten (Warren et al., 1974; Heskett et al., 1976). Die Aktivität der ATPase wird durch diese nahegelegenen annulären Lipidmoleküle stärker beeinflusst, als durch weiter entfernt gelegene Lipide.

In den letzten Jahren wurden viele Arbeiten veröffentlicht, die die Lipidabhängigkeit von membrangebundenen Enzymen beschreiben (Übersichtsartikel: Sandermann, 1978). Es konnte dabei gezeigt werden, daß besonders hydrophobe Enzyme lipidabhängig sind. In diesem Zusammenhang wurde auch der von der Lipidstruktur abhängige Einfluss der Membranfluidität auf die Aktivität der membrangebundenen Enzyme untersucht.

Einige der ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Lipidabhängigkeit von Enzymaktivitäten wurden an mitochondrialen Enzymen durchgeführt. Die

Erkenntnis, daß die β -Hydroxybutyratdehydrogenase einen spezifischen Bedarf für Phosphatidylcholin zeigt, war eine der ersten Beschreibungen eines lipidabhängigen Enzyms (Jurtshuk et al., 1961).

Die ersten Untersuchungen über die Bedeutung der Membranfluidität auf die Membranfunktion wurden an Lipidmutanten von *E.coli* durchgeführt. Deren Membranlipide ließen sich durch Kultivierung mit verschiedenen Fettsäuren spezifisch in der Fluidität variieren (Silbert et al., 1974). Für die Acyl-CoA: Glycerin-3-Phosphatacyltransferase und die Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase aus *E.coli* konnte eine Abhängigkeit der Enzyme von den angebotenen Fettsäuren nachgewiesen werden (Mavis und Vagelos, 1972). Eine weitere Abhängigkeit von der Lipidstruktur wurde für die Succinatdehydrogenase und den Prolintransport in *E.coli* beschrieben (Esfahani et al., 1971).

Andere Autoren fanden einen Einfluß der Fettsäurezusammensetzung auf die allosterische Regulation von Enzymen (Farias et al., 1975). In diesen Arbeiten wird diskutiert, wie der Einfluss der Fettsäurezusammensetzung auf den Hill-Koeffizient eine besonders empfindliche Anzeige für Lipid-Proteinwechselwirkungen darstellt.

Die Abhängigkeit zwischen Enzymaktivität und Lipidstruktur wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen an membrangebundenen ATP'asen untersucht. Durch Waschen mit Desoxycholat ließen sich Phospholipide und Cholesterin aus Plasmamembranen von Nierenzellen entfernen. Dadurch wurde die Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase vollständig gehemmt. Durch exogene Zugabe von Phospholipiden ließ sich die Aktivität des Enzyms wieder teilweise reaktivieren (Wheeler et al., 1975).

Kimelberg (1975) beschrieb für die Untersuchungen am gleichen System einen Einfluss der Phospholipide und des Cholesterins auf die Fluidität der Plasmamembranen der Nierenzellen.

Auch für die $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase in Erythrozytenmembranen ließ sich die Lipidabhängigkeit des Enzyms durch Entfernen der Lipide und Rekonstitution der Membranstruktur zeigen (Röner et al., 1977).

Fiehn und Hasselbach untersuchten die Wirkung von verschiedenen Fettsäuren auf den Calcium-Transport und die Ca^{2+} -ATPase in Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel. Durch Inkubation der Membran mit Phospholipase- A_2 ließ sich der Calcium-Transport hemmen. Die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase wurde jedoch erst durch Herauswaschen der Spaltprodukte der Phospholipidhydrolyse mit Rinderserumalbumin gehemmt. Die anschließende Rekonstitution der Ca^{2+} -ATPase durch verschiedene Fettsäuren und Lysophosphatidylcholin zeigte eine höhere Effektivität für ungesättigte Fettsäuren, wie Ölsäure und Arachidonsäure, gegenüber von gesättigten Fettsäuren wie Stearinsäure (Fiehn und Hasselbach, 1970).

Durch Untersuchung der Fluidität von derart vorbehandelten Membranen durch ESR-Spektroskopie wurde festgestellt, dass die Fluidität direkt mit der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase verknüpft ist (Seelig und Hasselbach, 1971).

Für das Rekonstitutionsvermögen von verschiedenen Fettsäuren konnte ein Zusammenhang mit der Kettenlänge der Fettsäuren festgestellt werden. Für gesättigte Fettsäuren war eine Kettenlänge von C_{16} und C_{18} unwirksam für die Rekonstitution der Ca^{2+} -ATPase. Dagegen zeigten C_{12} - und C_{14} -Fettsäuren einen hohen Rekonstitutionseffekt für die Enzymaktivität (Swoboda et al., 1979). Für die Untersuchung von Lipid-Proteinwechselwirkungen stellen Rekonstitutionsexperimente ein wichtiges Hilfsmittel dar. Die Aussage der Methode hängt dabei aber entscheidend davon ab, wie es gelingt, unspezifische Nebenwirkungen dieser Technik auf die Membranstruktur zu eliminieren.

Behandeln mit Detergenzien, Waschen mit organischen Lösungsmitteln oder einfaches Inkubieren der Membran mit Lipiden gibt nicht unbedingt die Gewähr, daß die rekonstituierte Struktur der Membran der nativen Struktur entspricht. Auch die Zugabe von nicht kovalent gebundenen Fettsäuren kann nur bedingt den spezifischen Einfluss verschiedener Fettsäuren in nativen Membranen beschreiben.

1.2 Frühe Ereignisse bei der Stimulation von Lymphozyten

Das System der Aktivierung von Lymphozyten durch Lectine hat sich in den letzten Jahren bei der Untersuchung des Übergangs von Zellen aus der Ruhephase in einen aktiven Zustand bewährt. Vor der Zugabe eines Mitogens befinden sich die Lymphozyten in einem Ruhezustand und zeigen keine Teilung. Durch die Zugabe des Mitogens läßt sich die Proliferation auslösen. Ein großer Nachteil dieses Systems liegt in der Heterogenität von Lymphozytenpopulationen.

Auch andere Zellen (z.B. Fibroblasten) zeigen die Möglichkeit, sich unter kontrollierten Bedingungen bis zu einem gewissen Grad zu vermehren, um dann ihr Wachstum wieder einzustellen. Der dabei wirkende Mechanismus wird heute noch kaum verstanden, obwohl er für die Organisation des Lebens von größter Bedeutung ist. Die Aufklärung der Regulation des Wachstums von Zellen ist heute einer der wichtigsten Ansatzpunkte innerhalb der Tumorforschung.

Bei der Untersuchung der Lymphozytenstimulation wurde einerseits versucht, den Rezeptor für das Mitogen auf der Lymphozytenoberfläche zu charakterisieren, andererseits wurde versucht, die durch die Bindung des Mitogens an den Rezeptor ausgelösten biochemischen Reaktionen aufzuklären.

Rezeptoren für Mitogene wie ConA und PHA sind keine Besonderheit der Lymphozyten, sondern lassen sich auf allen Zellen von Säugetieren in gleicher Größenordnung nachweisen. Es konnten auch keine Hinweise dafür gefunden werden, daß diese sich in ihrer Art von den Lymphozytenrezeptoren unterscheiden. Bei der Inkubation von Mäusefibroblasten mit ConA wurde genauso wie bei Lymphozyten ein Zusammenfließen der Rezeptoren ("capping") beobachtet (Comoglio und Guglielmone, 1972). Dieses Zusammenfließen läßt sich durch die Temperatur beeinflussen. Im Gegensatz dazu ist die Bindung des Mitogens an den Rezeptor nicht vom Stoffwechsel der Zelle abhängig.

Auch durch Hitze abgetötete oder in ihrer ATP-Synthese gehemmte Lymphozyten zeigen eine ähnlich gute Bindung des Mitogens wie intakte Zellen (Lindahl-Kiesling und Mattson, 1971).

Alle gereinigten Lectine, die bisher untersucht wurden, enthalten zweiwertige Kationen, wie Ca^{2+} oder Mn^{2+} . Werden diese durch Chelatbildner wie EDTA vom Mitogen entfernt, so verliert es auch die Fähigkeit, an den Lymphozytenrezeptor zu binden (Kay, 1971). Durch kovalentes Verknüpfen des Mitogens an Sepharose oder an Polyacrylamid konnte gezeigt werden, daß der Kontakt des Mitogens mit dem Rezeptor für die Auslösung der Stimulation genügt. Das Mitogen muß nicht durch die Zellmembran in die Zelle eindringen, um wirksam zu werden (Greaves und Bauminger, 1972; Betel und van den Berg, 1972).

Die Stimulation des Lymphozyten ist aber keine direkte Folge der Bindung des Mitogens. Lectine, die zwischen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten unterscheiden können, wie z.B. PHA oder ConA, binden genauso gut an beide Zellarten, aktivieren aber jeweils nur eine (Stobo et al., 1972; Greaves et al., 1972).

Von verschiedenen Autoren wurde die These vertreten, daß das Verknüpfen mehrerer Rezeptoren durch das Mitogen für die Aktivierung von Bedeutung sei. Lymphozyten von Menschen und Kaninchen liessen sich nur durch divalente und nicht durch monovalente Fragmente aus Antilymphozytenserum aktivieren (Fanger et al., 1970; Sell et al., 1970). Nach der Bindung des Mitogens an den Rezeptor lassen sich in der Lymphozytenplasmamembran Veränderungen in den Transporteigenschaften feststellen. Dabei zeigen vor allem niedermolekulare Moleküle eine erhöhte Transportrate. Dazu gehören Nukleoside und Cholin (Peters und Hausen, 1971), Aminosäuren (van den Berg und Betel, 1973), Phosphat (Cross und Ort, 1971), K^+ (Quastel und Kaplan, 1971), Na^+ (Dent, 1971) und Ca^{2+} (Allwood et al., 1971). Dieser Transport scheint eines der ersten Ereignisse bei der Lymphozytenstimulation in der Zelle zu sein.

Für das Mitogen ConA wurde gezeigt, daß es eine Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase in Rattenlymphozyten bewirkt (Novogrodsky, 1972). Dabei bleibt der K_M -Wert des Transports konstant, während sich der V_{max} -Wert erhöht. Für den Ca^{2+} -Transport wurden entgegengesetzt liegende Verhältnisse beobachtet. Dort bleibt der V_{max} -Wert konstant und der K_M -Wert nimmt ab (Whitney und Sutherland, 1973). Hier scheint das Mitogen die Affinität des Transportsystems für dieses Ion zu erhöhen. Dieser erhöhte Transport von Ionen- und Aminosäuren könnte eine Verbindung vom Rezeptor zum Stoffwechsel der stimulierten Lymphozyten bilden. Die RNA- und DNA-Synthese von Zellhybriden wird durch die cytoplasmatische Umgebung beeinflusst. Die erhöhte Aufnahme von K^+ -Ionen während der Lymphozyten-Stimulation lässt sich durch Ouabain hemmen. Dadurch wird trotz erhöhtem Einbau von Uridin in die RNA sowohl die Proteinsynthese (Kay, 1972) wie auch die DNA-Synthese (Quastel und Kaplan, 1968) verhindert.

Die Proteinsynthese in nicht stimulierten Lymphozyten wird dagegen durch Ouabain nicht beeinflusst.

Neuere Untersuchungen auf diesem Gebiet zeigten, daß die erhöhte Aufnahme von K^+ -Ionen durch eine gleichzeitige Abgabe des Ions von der Zelle ausgeglichen wird (Kaplan, 1979). Durch diese Abgabe von K^+ -Ionen ändert sich trotz aktivierter Na^+ , K^+ -ATPase die Konzentration von Na^+ - und K^+ -Ionen nicht in der Zelle (Segel und Lichtman, 1976; Iversen, 1976; Hamilton und Kaplan, 1977). Der Mechanismus und die Bedeutung dieses energieaufwendigen Vorgangs für die Lymphozytenstimulation, der an sich keine beobachtbaren Vorteile mit sich bringt, wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Es ist bekannt, dass die Na^+ -Konzentration in der Zelle eine wichtige Bedeutung für die Aktivität der Na^+ , K^+ -Pumpe hat. Es wird vermutet, daß während der Lymphozytenaktivierung kationenspezifische Kanäle geöffnet werden, die K^+ - gegen Na^+ -Ionen austauschen. Dies muß dann durch eine erhöhte Aktivität der Na^+ , K^+ -Pumpe ausgeglichen werden. Dieser Abbau des Na^+ , K^+ -Gradienten durch spezifische Ionenkanäle könnte mit dem Aminosäuretransport gekoppelt sein und so einen wichtigen Schritt bei der Lymphozytenaktivierung darstellen (Schultz und Curran, 1970).

Andere Autoren sehen einen Vorteil in der erhöhten Durchlässigkeit der Lymphozytenplasmamembran darin, dass dadurch Mediatoren wie z.B. Lymphokine freigesetzt werden können (Segel und Lichtman, 1976).

Möglicherweise befinden sich die Na^+ , K^+ -Konzentrationen nur noch kurzzeitig im gleichen Verhältnis wie in der ruhenden Zelle, um dann bei der Volumenzunahme nach 24 Stunden durch erhöhte Aufnahme von K^+ -Ionen den Na^+ / K^+ -Gradienten zu erhalten (Kaplan, 1977). Für Reticulozyten

konnte gezeigt werden, dass K^+ -Ionen für die Proteinsynthese von Bedeutung sind. Dabei wirken K^+ -Ionen auf der Stufe der Kettenverlängerung einer entstehenden Polypeptidkette (Cohen und Lubin, 1978).

Eine andere Hypothese besagt, daß mit der Lymphozytenstimulation eine Abnahme von cyclo-AMP einhergeht (Berridge, 1975). Eine verstärkte Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität tritt in Konkurrenz zur Adenylatcyclase und kann so die cyclo-AMP Konzentration reduzieren. In Mäuseplasmacytomzellen konnte nach Hemmung der Na^+ , K^+ -ATPase mit Ouabain eine erhöhte cyclo-AMP Konzentration nachgewiesen werden, was auf einen Zusammenhang zwischen Na^+ , K^+ -ATPase und cyclo-AMP Konzentration hindeutet (Lelievre et al., 1977).

1.3 Einfluß von plasmamembrangebundenen Fettsäuren auf die Immunantwort

Die Plasmamembran von Lymphozyten enthält hauptsächlich Protein, Phospholipide und Cholesterin. In ruhenden Lymphozyten befinden sich in 2-Stellung des Phosphatidylcholins bzw. des Phosphatidyläthanolamins im Vergleich zu Rattenleberzellen wenig ungesättigte Fettsäuren (Ferber et al., 1975). Das Verhältnis von gesättigten gegen ungesättigte Fettsäuren in membrangebundenen Lipiden bedingt den Grad der Fluidität der Membran. Dabei zeigt ein höherer Anteil von ungesättigten Fettsäuren eine höhere Fluidität (Overath und Träuble, 1973). Bei der Stimulation von Lymphozyten ändert sich die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide in der Plasmamembran. Dabei erhöht sich am eindrucksvollsten der Gehalt an Arachidonsäure in 2-Stellung von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylcholin (Ferber et al., 1975).

Die Arachidonsäure wird nicht durch eine *de novo* Synthese von Phospholipiden in die Membran eingebaut, sondern durch Austausch von Fettsäuren in die vorhandenen Phospholipiden eingeführt (Resch und Ferber, 1972).

Für den Einbau der Arachidonsäure in die Lymphozytenplasmamembran ist eine Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase erforderlich. Dieses Enzym zeigt eine hohe Spezifität für ungesättigte Fettsäuren und läßt sich durch Mitogene wie PHA oder ConA aktivieren (Ferber und Resch, 1973). Für die Aktivierung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase wird ein direkter Zusammenhang mit der Bindung des Mitogens an den Rezeptor angenommen. Weder die Bindung des Rezeptors noch die Enzymaktivierung wird durch Puromycin oder durch tiefe Temperaturen (4°C) verhindert, was schließen läßt, dass beide Prozesse weder eine Proteinbiosynthese noch einen Energiestoffwechsel benötigen. Beide Prozesse sind bei 37°C während 30 Minuten abgeschlossen. Wird ConA vom Rezeptor durch α -Methylmannosid, einem kompetitiven Inhibitor für die Rezeptorbindung, wieder entfernt, so wird davon auch die Enzymaktivität beeinflusst. Durch Isolierung von Membranarealen konnte gezeigt werden, daß Bereiche von hoher Rezeptoraffinität auch eine hohe Aktivität der Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholinacyltransferase zeigen (Ferber und Resch, 1976).

Die Kinetik der Mitogenbindung an den Rezeptor verläuft in der hyperbolischen Form einer einfachen Sättigungskinetik. Die Aktivierung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase zeigt dagegen eine sigmoide Kinetik. Diese könnte dadurch erklärt werden, daß für die Aktivierung des Enzyms durch den besetzten Rezeptor ein Zusammenlagern mehrerer Rezeptoren durch das Mitogen verantwortlich ist (Ferber und Resch, 1976).

Aus dem Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung des Mitogens und Aktivierung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase läßt sich vermuten, daß der Einbau von ungesättigten Fettsäuren in die Lymphozytenplasmamembran eine wichtige Bedeutung für den Stimulationsvorgang hat. Der Einfluß des Ionenflusses und die Wirkung cyclischer Nukleotide auf die Lymphozytenstimulation könnte so in einen Zusammenhang mit dem Mitogen-Rezeptorkomplex gebracht werden. Für beide Prozesse ist in anderen Systemen eine Abhängigkeit von der Lipidstruktur bekannt (Demel et al., 1972; Engelhardt et al., 1976).

Aus den bisherigen Versuchsergebnissen läßt sich nicht erkennen, inwieweit die erhöhte Fluidität nach Mitogenbindung an den Rezeptor (Ferber et al., 1974; Barnett et al., 1974) biochemische Prozesse in der Lymphozytenmembran beeinflusst und wie diese erhöhte Fluidität sich auf einen verstärkten Einbau von ungesättigten Fettsäuren zurückführen läßt.

Für den Einbau von Arachidonsäure in die Lymphozytenplasmamembran über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase müssen vorher die entsprechenden Lysoverbindungen aus den Phospholipiden gebildet werden. Für die Abspaltung einer Fettsäure aus Phospholipiden ist in anderen Systemen eine Phospholipase-A₂ nachgewiesen worden. Thymozytenplasmamembranen zeigen jedoch nur Spuren einer Phospholipase-A₂-Aktivität. Diese läßt sich auch durch Stimulation des Lymphozyten kaum aktivieren (Resch et al., 1971). Andere Möglichkeiten des Lymphozyten, Fettsäuren aus Phospholipiden abzuspalten, sind nicht bekannt.

Möglicherweise wird durch den engen Kontakt der Lymphozyten mit Makrophagen während der Stimulation Phospholipase-A₂ von der Makrophagenplasmamembran am Lymphozyten wirksam (Ferber et al., 1980). Phospholipase-A₂ bzw. Lysophosphatidylcholin könnte so einer der vom Makrophagen auf den Lymphozyten übertragenen Mediatoren sein.

Während der Lymphozytenstimulation wurde eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren in der Plasmamembran gefunden (Cyong und Okada, 1976). Inwieweit diese als Substrat für den Einbau in Lipide dienen, oder durch Hydrolyse aus Phospholipiden entstanden sind, ist noch nicht untersucht worden.

Es wurde auch die Hypothese aufgestellt, daß diese freien Fettsäuren über ihre lytischen Eigenschaften andere Zellen im Laufe der Immunantwort angreifen können. Der hexanlösliche Lipidextrakt von stimulierten Lymphozyten zeigt in diesem Sinn lytische Aktivitäten gegenüber Erythrozyten (Okada und Cyong, 1975).

Einige Autoren vermuten eine Wirkung freier Fettsäuren durch die Korrelation mit dem Cholesteringehalt der Lymphozytenplasmamembran. Bei einem erhöhten Cholesteringehalt findet sich auch eine höhere Fettsäurekonzentration in den Lymphozyten (Kigoshi, 1976). Wie die Fettsäurekonzentration den Cholesteringehalt oder umgekehrt, der Cholesteringehalt die Fettsäurekonzentration beeinflusst, ist dabei noch nicht bekannt.

Da die Arachidonsäure eine Vorstufe von Prostaglandinen ist, wird auch ein Einfluss dieser Fettsäuren über die Prostaglandinsynthese diskutiert. Für Prostaglandine des Typ E wurde von mehreren Autoren eine Hemmung der T-Zellstimulation durch PHA beobachtet (Offner und Clausen, 1974; Stockman und Mumford, 1974).

Auch die Cytotoxizität von T-Zellen kann durch Prostaglandine gehemmt werden (Strom et al., 1977). Während der Immunantwort von Milz-Zellen oder von ungereinigten menschlichen peripheren Lymphozyten bilden sich in vitro verstärkt Prostaglandine (Ferraris et al., 1974). Peritoneale Exsudatzellen (60-80% Makrophagen, 10% Lymphozyten) bilden dabei mehr Prostaglandine als Lymphozyten aus Lymphknoten (90% Lymphozyten).

Daraus wurde geschlossen, daß vor allem Makrophagen, welche durch Lymphokine aktiviert werden, für die Prostaglandinbildung verantwortlich sind (Gordon et al., 1976). Da diese Prostaglandine das Wachstum von Lymphozyten beeinflussen, wurde ihnen ein regulierender Einfluß auf die Entwicklung von Immunzellen zugesprochen (Morley, 1974). Die Hypothese einer solchen feed-back Regulation wird durch Experimente unterstützt, die zeigen, daß Inhibitoren der Prostaglandinsynthese die Antikörpersynthese gegen Schafserythrozyten verstärken (Osheroff et al., 1975; Webb und Osheroff, 1976).

Prostaglandine können die Abgabe lysosomaler Enzyme aus Makrophagen hemmen. Dies führt dazu, daß weniger freie Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) nachgeliefert werden und die Prostaglandinsynthese sich durch ihre Produkte selbst über einen negativen feed-back Mechanismus reguliert (Zurier et al., 1971; Ignarro et al., 1973).

Für die Prostaglandinsynthese ist die Konzentration an Arachidonsäure von großer Bedeutung. Durch exogene Zugabe von Arachidonsäure zu neoplastischen Mäusezellen ließ sich die Biosynthese von Prostaglandinen erhöhen (Hong et al., 1976). Durch die Freisetzung von Arachidonsäure im Laufe der Lymphozytenstimulation ließe sich über die Bildung von Prostaglandinen eine negative feed-back Regulation der Stimulation erklären.

Die Wirkung von freien Fettsäuren auf das Immunsystem wurde auch direkt durch subcutane Injektion in Mäusen untersucht (Meade und Mertin, 1976). Am Anfang der Reaktion wurde die Immunantwort gegen Antigene aktiviert. Nach einiger Zeit kehrte sich das Bild um und es konnte eine Hemmung beobachtet werden. Diese Studien wurden vor allem mit Linolensäure durchgeführt. Arachidonsäure zeigt aber in diesem Sinn ein noch ausgeprägteres Verhalten. Dies deutet darauf hin, daß ungesättigte Fett-

säuren auf der einen Seite die Immunantwort unterstützen, auf der anderen Seite aber, möglicherweise durch Bildung von Prostaglandinen, die Immunantwort hemmen.

Die hier dargestellten Wirkungen von Fettsäuren auf das Immunsystem lassen sich heute erst ungenau in ihrer Bedeutung beschreiben. Dies beruht sicher auch darauf, daß bisher die Untersuchung von Proteinen stark im Vordergrund der immunologischen Forschung stand. Proteine ließen sich methodisch besser untersuchen. Die Möglichkeit, spezifische Antikörper gegen Proteine zu gewinnen, war hierbei auch ein Vorteil. Andererseits sind die Techniken der Lipidanalytik nur in wenigen immunologischen Laboratorien eingeführt. Durch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet muß noch gezeigt werden, wie sich die Bedeutung der Lipidbiochemie innerhalb der Immunologie entwickeln wird.

Die bisher vorhandenen Ansatzpunkte sind in diesem Zusammenhang recht erfolgversprechend.

2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Die Arbeiten von Ferber und Resch (1976) haben gezeigt, daß die Stimulation von Lymphozyten durch Lectine von der Aktivierung einer plasmamembrangebundenen Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase begleitet wird. Dieses Enzym zeigt eine hohe Spezifität für den Einbau von Arachidonsäure in Lysophospholipide der Lymphozytenplasmamembran. Andere Fettsäuren wie z.B. Ölsäure oder Palmitinsäure zeigen geringere Umsatzraten bei der enzymatischen Acylierung von Lysophospholipiden. Die Bedeutung der in die Phospholipide eingebauten Arachidonsäure bei der Stimulation von Lymphozyten ist bisher jedoch noch unbekannt.

Das auslösende Signal, das bei der Bindung des Lectins an die Plasmamembran entsteht, muß während des Aktivierungsvorganges durch die Plasmamembran in die Zelle weitergeleitet werden. Der kausale Ablauf dieser Prozesse ist bisher jedoch noch nicht aufgeklärt. Von verschiedenen Autoren sind Vorgänge in der Plasmamembran beschrieben worden, die für die Aktivierung des Lymphozyten zur Proliferation von Bedeutung sind (Ling und Kay, 1975). In diesem Zusammenhang scheinen besonders Transportvorgänge von Ionen, Aminosäuren und Nukleotiden in der Plasmamembran ursächlich mit dem Stimulationsvorgang verbunden zu sein.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in seiner grundsätzlichen Richtung in der Untersuchung von enzymatischen Reaktionen in der Lymphozytenplasmamembran, die durch die Struktur der Fettsäuren der membrangebundenen Phospholipide beeinflusst werden. Dabei wurde vermutet, daß der Einfluß der Fettsäurestruktur auf die Membranstruktur auch für die Regulation von Enzymen der Lymphozytenplasmamembran wichtig ist. Unsere Hoffnung lag darin, eine Membranfunktion beschreiben zu können, die spezifisch durch die Arachidonsäure reguliert wird. Diese

könnte im Zusammenhang mit der für die Arachidonsäure spezifischen Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase den Anfang einer kausalen Folge von Reaktionen beschreiben, die von der Bindung des Lectins an den Rezeptor der Lymphozytenplasmamembran bis zur Proliferation des Lymphozyten reicht.

Neben der speziellen Aufgabe der phospholipidgebundenen Arachidonsäure sollten auch andere Regulationsmöglichkeiten von Enzymaktivitäten der Lymphozytenplasmamembran durch Lipidfettsäuren untersucht werden.

Solche Untersuchungen wurden an anderen Membransystemen über Rekonstitutionsexperimente nach vorheriger Entfernung von Lipiden durchgeführt (s. Einleitung). Die bisher in der Literatur beschriebenen Rekonstitutionstechniken haben im Vergleich zu den Möglichkeiten des Lipidaustauschs in den Membranen der intakten Zelle einen artifiziellen Charakter.

Die Untersuchung von Lipid-Proteinwechselwirkungen und speziell von Fettsäure-Enzymwechselwirkungen sollte in dieser Arbeit durch einen enzymatischen Austausch der Phospholipidfettsäuren durch Inkubation mit Phospholipase A₂ und über die membrangebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase durchgeführt werden. Eine solche Rekonstitutionstechnik sollte Vorteile gegenüber den bisher bekannten Techniken zeigen. Der enzymatische Austausch von Fettsäuren lehnt sich eng an die Vorgänge in der Lymphozytenplasmamembran in situ an und sollte gute Aussagen über die Bedeutung von phospholipidgebundenen Fettsäuren in der Lymphozytenmembran zulassen.

Ein wichtiger Parameter, der die Membranstruktur beschreibt, läßt sich unter dem Begriff Membranfluidität zusammenfassen. Es sollte durch diese Arbeit geklärt werden, welche Enzymsysteme in der Lymphozytenplasmamembran durch Änderung der Membranfluidität reguliert werden, und auf

welche Weise solche Fluiditätsveränderungen in der Membran ausgelöst werden können.

Durch die Übertragung des Fettsäureaustauschs aus dem in situ in ein in vitro System erhofften wir uns Einblicke in die Regulation der Deacylierungs-Reacylierungsschritte zu erhalten. Dies betrifft besonders den Deacylierungsschritt, für den das zugehörige Enzym einer Phospholipase A_2 bisher nur in Spuren in der Lymphozytenplasmamembran beobachtet werden konnte.

3. METHODEN

3.1 Gewinnung von Plasmamembranen aus Kalbsthymozyten

3.1.1 Präparation der Zellsuspension (Brunner et al., 1978)

Für die Präparation von Kalbsthymozyten wurden Thymi von ungefähr vier Monate alten Tieren aus dem örtlichen Schlachthof verwendet. Die Thymi wurden sofort nach dem Tod der Tiere in PBS (pH = 7,4; 315 mosmol/l; 4°C) gelegt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die Thymi wurden mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und von Fettgewebe und Haut befreit. Kleine Stücke der Kalbsthymi wurden in einem Homogenisator (Braun, Melsungen) vorsichtig homogenisiert und anschliessend durch Nylonwolle filtriert. Die Thymozyten wurden bei 1200 UpM abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Durch Trypanblauausschluß konnte gezeigt werden, daß 90-97% der Thymozyten intakt waren.

3.1.2 Zellaufschluss und Membranpräparation

Die Kalbsthymozyten wurden vor dem Aufschluss nochmals gewaschen und mit Aufschlußpuffer (10 mM-HEPES, pH = 7,4; 0,5 mM-MgCl₂; 0,15 M NaCl) auf 1×10^8 Zellen/ml verdünnt. Der Zellaufschluß erfolgte nach der "nitrogen cavitation"-Methode (Wallach und Kamat, 1969). Die Zellsuspension wurde in einer Artisan-Pumpe (Artisan Metal Products, Waltham, Mass., USA) unter einem Druck von 50 atm N₂ 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 4°C gerührt. Bei einem Druck von 30 atm wurde die Rührzeit auf 20 Minuten verlängert. Nachdem die Zellsuspension tropfenweise aus der Pumpe entlassen wurde, platzten die Zellen unter dem erhöhten Druck, der in der Zelle wirkte. Mit dieser Methode ist es möglich, nur die äussere Zellmembran zu desintegrieren, während andere Orga-

nellen, wie z.B. Kerne, intakt bleiben und sich gut abtrennen lassen (Ferber et al., 1971). Die Suspension wurde über Gaze filtriert und das Homogenat bei 1500 UpM während 15 Minuten zentrifugiert (J 21-Zentrifuge, Beckman; Rotor Ja 14).

Das Sediment dieser Zentrifugation enthält die Kerne. Der Überstand wurde in der gleichen Zentrifuge bei 14 000 UpM während 20 Minuten zentrifugiert. Durch diese Zentrifugation liessen sich die Mitochondrien sedimentieren. Nach Zentrifugation des zweiten Überstandes in einer Beckmann Ultrazentrifuge (L 3-50, L 2-65B) bei 50 000 UpM während einer Stunden (Rotor 50,2 oder 60 Ti) wurden die Mikrosomen noch zweimal in 10 mM-HEPES-Puffer gewaschen. Diese gereinigten Mikrosomen-Fraktion wurde dann mit Hilfe eines Saccharose-Dichtegradienten weiter subfraktioniert. Eine 45%ige Saccharose-Lösung (20 ml) wurde dafür mit 10 ml einer 35%igen Saccharose-Lösung überschichtet. In dieser waren vorher die Mikrosomen nach der letzten Zentrifugation resuspendiert worden. Die Röhrchen (Polykarbonat) wurden bis zum Rand mit 10 mM-HEPES-Puffer, pH 7,4, angefüllt. Die Gradienten wurden während zwei Stunden in der Ultrazentrifuge (Rotor 50,2 oder 60 Ti) bei 50 000 UpM zentrifugiert. Dabei bildeten sich neben dem Zentrifugat 2 Banden, von denen die obere die Plasmamembranvesikel enthielt. Diese obere Fraktion wurde vorsichtig abgenommen, in HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) resuspendiert und nochmals bei 50 000 UpM während 60 Minuten zentrifugiert.

Die Plasmamembranvesikel wurden anschliessend in einem 8%igen Saccharose-HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

Die Plasmamembranen wurden über ihre spezifischen Markerenzyme (γ -Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase) und den Cholesteringehalt charakterisiert (Brunner et al., 1977).

In dem eingefrorenen Zustand zeigten die plasmamembrangebundenen Enzyme bis zu 4 Wochen keinen Verlust an Enzymaktivität.

3.2 Biochemische Bestimmungen

3.2.1 Proteinbestimmung mit Ninhydrin

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode von Kabat und Mayer (1961) übernommen. Diese Methode ist in ihrer Sensitivität derjenigen von Lowry et al. (1951) vergleichbar.

Reagenzien:

Ansatz für 13 - 15 Bestimmungen:

8 mg SnCl_2 auf 5 ml Na-Citratpuffer (0,2 M, pH = 5,0)

80 mg Ninhydrin auf 2,5 ml Methylcellosolve

(Äthylenglycolmonoäthyläther)

Beide Lösungen jeweils frisch ansetzen und dunkel stellen.

Erst kurz vor Gebrauch mischen.

Citratpuffer: (0,2 M, pH = 5,0)

21,01 g Citronensäure/500 ml H_2O wurden mit einer gesättigten NaOH auf pH = 5,0 eingestellt.

Die zu messende Proteinlösung wurde in Schliffröhrchen mit 0,5 ml Reagenz gemischt und bei 100°C im Wasserbad 20 Minuten lang gekocht. Die inkubierten Proben wurden mit 2,0 ml Propanol/ H_2O (1:1) gut gemischt. Falls sich ein Niederschlag bildete, mußte bei 1 500 UpM 10 Minuten zentrifugiert werden. Die Extinktion wurde bei 578 nm gegen eine Kontrolle ohne Protein am Eppendorf-Photometer bestimmt. Als Standard für die Eichkurve diente Rinderserumalbumin (0,0469 mg/20 μl).

Testprinzip:

Bei der oxydativen Decarboxylierung der α -Aminocarbonsäure durch Ninhydrin bildet sich freier Ammoniak. Dieser reagiert weiter mit Ninhydrin zu einem blauen Farbstoff.

3.2.2 Analyse der Membranlipide

a) Lipidextraktion (Ways und Hanahan, 1964)

Zu 1 ml der lipidhaltigen Membransuspension wurden 5 ml Methanol und 5 ml Chloroform gemischt. Ein sich eventuell bildender Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 1 500 UpM abgetrennt und mit 2 ml Methanol und 5 ml Chloroform nachextrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden dann mit 3 ml 0.1 M-KCl versetzt und geschüttelt. Durch Abkühlen auf 0°C (Eis) liess sich die organische Phase von der wässrigen Phase trennen. Nach Erwärmen mit heissem Wasser klärten die beiden Phasen auf. Die obenauf-liegende wässrige Phase liess sich mit der Wasserstrahlpumpe absaugen. Die lipidhaltige Chloroformphase wurde dann nochmals mit 5 ml Methanol und 4 ml 0.1 M-KCl ausgeschüttelt.

b) Trennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie

Nach der Lipidextraktion wurden die einzelnen Lipide dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten aufgetrennt. Wir verwendeten in unseren Versuchen Kieselgel H (E. Merck, Darmstadt, BRD) als Adsorbens. Das Kieselgel wurde in Wasser mit 0,07% Tylose aufgeschwemmt und mit einer Schichtdicke von 0,75 mm auf Glasplatten aufgetragen (Streichgerät: Fa. Desaga, Heidelberg, BRD). Anschliessend trockneten die Platten an der Luft und wurden vor Gebrauch bei 110°C während einer Stunde im Trocken schrank aktiviert.

Als Fließmittel für die Chromatographie verwendeten wir ein Chloroform-Methanol-Wassergemisch (65:40:10, V:V:V). Das Anfärben der Platten erfolgte in einer mit Joddämpfen gesättigten Kammer. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß sich die Platten nach 12 Stunden an der Luft völlig entfärben. Diese Zeit kann durch Erwärmen im Trockenschrank verkürzt werden. Die einzelnen Lipidfraktionen liessen sich durch Abheben der vorher markierten Kieselgelschicht und anschliessendes Extrahieren mit Chloroform-Methanol-Wasser (65:40:10, V:V:V) isolieren. Radioaktiv markierte Lipide wurden direkt auf der abgehobenen Kieselgelschicht bestimmt. Dazu wurden die einzelnen Fraktionen in 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgenommen (Rotiszint; Fa. Carl Roth KG) und die Impulszahl pro Minute in einem Tricarb-Scintillationszähler (Tricarb Model 3380, Packard Instrument Comp., Downers Grove Ill., USA) gemessen. Die Phospholipide liessen sich auch direkt auf dem Kieselgel durch Phosphatbestimmung nach Gerlach-Deutike (s. dort) quantitativ bestimmen.

c) Quantitative Analyse der Phospholipide

Die Phospholipide wurden nach der dünnschichtchromatographischen Trennung auf Kieselgelplatten mit Perchlorsäure (Veraschungsreagenz) bei 300°C oxydiert. Dabei wird der organisch gebundene Phosphor in anorganisches Phosphat übergeführt. Dieses bildet mit einer Ammoniummolybdatlösung unter reduzierenden Bedingungen einen blauen Farbstoff (Molybdänblau).

Veraschungsreagenz: $60\% \text{ige } \text{HClO}_4 + 95\% \text{ige } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ (1:1)}$

Ammoniummolybdatlösung: 1%ige wässrige Lösung von
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$

Reduktionsreagenz: 0,15g 1-Amino-2 hydroxynaphthalin-
 sulfonsäure
 1g Na_2SO_3
 + 100 ml einer 15%igen Lösung von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

Zum Veraschen der Phospholipide wurden zu den isolierten Kieselgelfrak-
 tionen 0,14 ml Veraschungsreagenz gegeben und bei ca. 300°C mindestens 2
 Stunden lang erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 8 ml Ammoniummolyb-
 datlösung und 0,4 ml Reduktionsreagenz zugegeben. Durch zehnmütiges
 Inkubieren bei 100°C im Wasserbad entwickelte sich dann der Molybdän-
 blaukomplex. Danach wurde das Kieselgel abzentrifugiert und die Extink-
 tion bei 820 nm gemessen.

d) Gaschromatographische Bestimmung der Lipidfettsäuren

Nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Lipide auf Kieselgel-
 platten wurden die einzelnen Lipidfraktionen von den Platten abgekratzt, in
 Schmelzampullen gefüllt und mit 1,6 ml Methanol, 0,4 ml Benzol, 21,3 µg
 Heneicosansäure (C21:0, innerer Standard) und 35 µl konzentrierter Schwe-
 felsäure versetzt. Durch 4 Stunden lange Inkubation bei 70°C wurden die
 Lipidfettsäuren in die Fettsäuremethylester umgesetzt. Das Benzol-Metha-
 nolgemisch wurde mit Petroläther mehrmals ausgeschüttelt. Die vereinigt-
 en Petrolätherphasen wurden viermal mit 0,6 ml destilliertem Wasser
 gewaschen und unter N_2 -Atmosphäre am Rotationsverdampfer zur Trockne
 eingedampft. Das in Chloroform aufgenommene Fettsäuremethylester-
 gemisch wurde bei einer Injektionstemperatur von 250°C in den Gaschro-
 matographen (Perkin Elmar, Modell f20) eingespritzt. Als Trägergas für die
 Gaschromatographie diente N_2 .

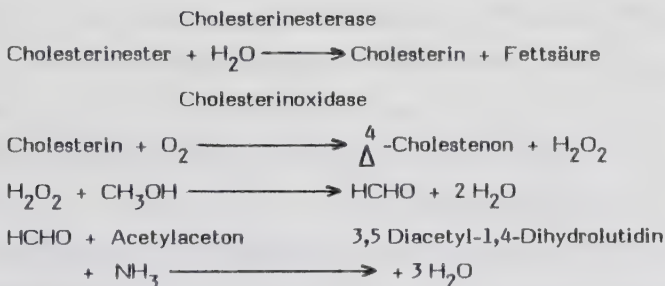
Die quantitative Auswertung erfolgte durch Integration der Peakflächen
 mittels eines Integrators (Hewlett Packard). Dabei wurden die Werte der
 verschiedenen Fettsäuremethylester auf den inneren Standard bezogen:

$$\mu\text{g Fettsäure} = \frac{\mu\text{g Standard} \times \text{Fläche Fettsäure}}{\text{Fläche Standard}}$$

e) Cholesterinbestimmung

Der Cholesteringehalt von Plasmamembranen wurde über die Cholesterinesterase/Cholesterinoxidase-Farbreaktion bestimmt (Röschlau et al., 1974)

Testprinzip



Reagenzien:

- | | | |
|----|---------------------------|---------------------|
| 1. | Puffer (Ammoniumphosphat) | 0,6 mol/l, pH = 7,0 |
| | Methanol | 1,7 mol/l |
| | Katalase | 700 U/ml |
| 2. | Acetylaceton | 0,4 mol/l |
| | Methanol | 2,5 mol/l |
| | Hydroxypolyäthoxydodecan | 2,1% |
| 3. | Cholesterinesterase | 7 U/ml |
| 4. | Cholesterinoxidase | 10 U/ml |

Aus diesen Reagenzien wird das Cholesterinreagenz bereitet und in einer braunen Flasche aufbewahrt.

Für ca. 20 Proben: Lösung 1 = 25 ml
 Lösung 2 = 1,25ml
 Lösung 3 = 0,1 ml
 Lösung 4 = 0,25ml

Zu 0,2 ml des in Aceton aufgenommenen Lipidextrakts (10-50 nMol Cholesterin) wurden 1 ml Cholesterinreagenz gegeben, gut gemischt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Extinktion der Probe wurde bei 405 nm gegen den Probenleerwert gemessen.

Der Cholesteringehalt wurde mit Hilfe einer Eichkurve gemessen.

3.2.3 Bestimmung der Mg^{2+} -Adenosintriphosphatase; Mg^{2+} -ATPase E.C.

3.6.1.3 (Bolstein, 1968)

Bei den in unserer Arbeit beschriebenen spezifischen Aktivitäten der Mg^{2+} -ATPase handelt es sich um den nicht mit Ouabain hemmbaren Anteil der Gesamt-ATPase. Der ouabainhemmbare Anteil der Gesamt-ATPase entspricht der Na^+, K^+ -ATPase.

Wurde für ein Reaktionssystem gezeigt, daß Ouabain keine Hemmung auf die Gesamt-ATPase ausübt, so wurde die Mg^{2+} -ATPase der Gesamt-ATPase gleichgesetzt.

Bestimmung der Gesamt-ATPase:

Reaktionsansatz:

Reaktionsvolumen	1 ml
Reaktionspuffer	5,0 μ Mol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
	0,1 mMol NH_4Cl
	0,15mMol NaCl
	0,1 mMol Imidazol, pH = 7,4

Substrat	300-600 nMol ATP (= 0,1 µC)
Enzymsuspension	8-40 µg Protein
Reaktionszeit	60 Minuten
Reaktionstemperatur	37°C

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz 5 Minuten in einem Eisbad abgekühlt und das Protein mit 4 ml 5%iger Trichloressigsäure (eiskalt) während 20 Minuten im Eisbad ausgefällt. Das Protein ließ sich danach bei 1500 UpM abzentrifugieren. Der Überstand wurde auf 3 ml gewaschene und trockengesaugte Aktivkohle (Norit A, Serva, Heidelberg, BRD) gegeben, aufgewirbelt und mit 0,2 ml Äthanol überschichtet. Das ADP und das nicht hydrolysierte ATP wird von der Aktivkohle absorbiert und läßt sich durch Zentrifugation von den während der ATPase-Reaktion abgespaltenen, radioaktiv markierten Phosphatanionen abtrennen. Vom Überstand wurde 1 ml mit 10 ml Aquasol (New England Nuclear) im Scillationszähler gemessen (Tricarb Model 3380, Packard Instrument Comp., Downers Grove III, U.S.A.).

Aus dem prozentualen Anteil der Radioaktivität im Überstand ließ sich nach Subtraktion des Kontrollwertes (Spontanhydrolyse) die Menge an Phosphat bestimmen, die in 1 Minute pro mg Protein aus ATP enzymatisch freigesetzt wurde.

3.2.4 Bestimmung der Na^+ , K^+ -Adenosintriphosphatase Na^+ , K^+ -ATPase (Robinson und Flashner, 1979)

Die ATPase, die sowohl Na^+ , K^+ - und Mg^{2+} -Ionen für ihre Aktivität benötigt und durch das Herzglykosid Ouabain (Strophantin) gehemmt wird, ist ein Teil des Enzymsystems, das Na^+ , aus der Zellen und K^+ in die Zelle transportiert (Post und Sen, 1967).

Zur Bestimmung der Na^+ , K^+ -ATPase wurde dem Ansatz zur Bestimmung der Gesamt-ATPase 0,1 μMol Ouabain zugesetzt. Der durch das Ouabain hemmbare Anteil der Gesamt-ATPase wurde der Na^+ , K^+ -ATPase zugeschrieben.

3.2.5 Bestimmung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase E.C.2.3.1.23.

a) Test mit radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin (Ferber und Resch, 1973)

Das in Chloroform/Methanol (2:1) gelöste, radioaktiv markierte Lysophosphatidylcholin (100 nMol/ml) wurde in einem Schliffröhrchen eingedampft und in 0,1 M-Phosphatpuffer, pH = 7,4, aufgenommen. Nach Zugabe der Membransuspension (8-40 μg) wurde die Reaktion mit Arachidonoyl-CoA gestartet.

Reaktionsansatz:

Reaktionsvolumen	1 ml
Lysophosphatidylcholin	50 nMol; 0,015 μC
Arachidonoyl-CoA	30 nMol
Membransuspension	8-40 μg
ad 1 ml mit Phospat-Puffer (0,1 M, pH = 7,4)	
Reaktionstemperatur	37°C
Reaktionszeit	10 Minuten

Die Reaktion wurde während 5 Minuten im Eisbad gestoppt. Danach wurden die Lipide nach der Methode von Hahnahan extrahiert. Dem Lipidextrakt wurde ein Gemisch nicht radioaktiv markierter Lipide (Phospholipide, Neutrallipide, Fettsäuren) zugesetzt. Diese ermöglichen später die Identifizierung der Lipide auf der Dünnschichtplatten nach Jod-Färbung.

Die Trennung der Lipide erfolgte auf Dünnschichtplatten analog dem in 2.2.2 b) beschriebenen Verfahren. Die verschiedenen Lipid-Fractionen wurden von der Kieselgelplatte abgehoben, in 10 ml Scintillations-Cocktail (PPO, POPOP, Toluol; Rotiszint; Fa. Carl Roth KG) aufgenommen und im Scintillationszähler gemessen. Aus der Prozentverteilung der Radioaktivität ließ sich der aus Lysophosphatidylcholin mit Hilfe der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase gebildete Phosphatidylcholinanteil bestimmen.

b) Optische Bestimmung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase

Das Enzym überträgt während der Enzymreaktion eine Acyl-Gruppe aus dem Acyl-CoA auf das Lysophosphatidylcholin. Dabei wird Coenzym A freigesetzt (Lands und Hard, 1965). Die Reaktion läßt sich durch die Bestimmung der freien SH-Gruppen des Coenzym A verfolgen. Freie SH-Gruppen reagieren mit Ellmans-Reagenz (5,5'-Dithiobis- [2-Nitrobenzoesäure]) zu einem gelben Farbstoff, dessen Extinktion bei 405 nm kontinuierlich während der Enzymreaktion bestimmt wurde.

Die Extinktionszunahme des Reaktionsansatzes ohne Lysophosphatidylcholin entspricht der Reaktion einer Acyl-CoA-Hydrolase.

Reaktionsansatz:

Reaktionsvolumen	1 ml
5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB)	500 nMol
Arachidonoyl-CoA	60 nMol
Lysophosphatidylcholin	100 nMol
Membransuspension	8-40 µg
aufgefüllt auf 1 ml mit Phosphat-Puffer (0,1 M, pH = 7,4)	

Molarer Extinktionseffizient $15 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{E \times \text{Testvolumen (ml)}}{0,015 \times \text{mg} \times \text{min}} \quad (\text{nMol/mg} \times \text{min})$$

3.2.6 Bestimmung der γ -Glutamyltransferase (γ -GT) E.C. 2.3.2.2.

Die γ -Glutamyltransferase katalysiert bei dem von uns verwendeten Test den Transfer des γ -Glutamylrestes von L- γ -Glutamyl-3-Carboxy-4-Nitroanilid auf Glycylglycin und setzt dabei 5-Amino-2-Nitrobenzoat frei. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der γ -Glutamyltransferase wurde die Extinktion des 5-Amino-2-Nitrobenzoats bei 405 nm gemessen (Persijn et al., 1976).

Reaktionsansatz:

Reaktionsvolumen	max. 0.72 ml
Reaktionspuffer	50 μMol Trishydroxyaminomethan, pH = 8,25
Glycylglycin	50 μMol
L- γ -Glutamyl-3-Carboxy-4-Nitroanilid	2,0 μMol
Albumin	20 μg
Membransuspension	max. 0,2 ml
Reaktionszeit	10-60 Minuten
Reaktionstemperatur	37°C
Molarer Extinktionskoeffizient	$9,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{E \times \text{Testvolumen (ml)}}{0,0095 \times \text{mg} \times \text{min}} \quad (\text{nMol/mg} \times \text{min})$$

Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 500 μl 10%iger Trichloressigsäure gestoppt. Das Protein flockte nach 20 Minuten im Eisbad aus und konnte abzentrifugiert werden.

Der Überstand konnte direkt in eine Halbmikroküvette dekandiert und die Extinktion bei 405 nm gemessen werden.

3.2.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase E.C. 3.1.3.1.

Die im alkalischen Bereich wirkende Orthophosphorsäure-Monoesterphosphohydrolase katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoester. Während der Testreaktion wurde die enzymatische Freisetzung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenylphosphat bestimmt.

Die Extinktion des p-Nitrophenols wurde bei 405 nm bestimmt (Ey und Ferber, 1977).

Reaktionsansatz:

Reaktionsvolumen	1,0 ml
Puffer: Diäthanolamin	100 µMol
MgCl ₂ x6H ₂ O	1 µMol
Triton X 100	0,5%
Substrat: p-Nitrophenylphosphat	2,5 µMol
Membransuspension	4-400 µg
Reaktionszeit	5-600 Minuten
Reaktionstemperatur	37°C
Molarer Extinktionskoeffizient	$17,84 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{E \times \text{Testvolumen (ml)}}{0,0179 \times \text{mg} \times \text{min}} \quad (\text{nMol/mg} \times \text{min})$$

Die Reaktion wurde nach leichter Gelbfärbung des Reaktionsansatzes (variable Inkubationszeit) mit 0,2 ml 5N-NaOH gestoppt. Die Extinktion der Probe wurde bei 405 nm bestimmt.

3.3 Bestimmung der Fluidität von Thymozytenplasmamembranen durch Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie

Für die Bestimmung der Fluidität von Plasmamembranen wurde von uns die Technik der Fluoreszenzpolarisation angewendet (Shinitzky und Barenholz, 1978). Diese Methode hat einige wichtige Vorteile gegenüber den ESR- und NMR-Techniken. Sie läßt sich einfach auf das komplexe System einer biologischen Membran anwenden, ist sehr empfindlich, reproduzierbar und kann sofort interpretiert werden. Dabei wird in Kauf genommen, daß die Ergebnisse Durchschnittswerte darstellen. Bei der Diskussion der Ergebnisse wird eine Gleichverteilung des fluoreszierenden Agens über die gesamte Membran angenommen. Diese Methode hat, obwohl nicht ohne Widerspruch von seiten einiger Membranbiophysiker, in Anbetracht der Vorteile Eingang in viele Laboratorien gefunden.

Die aus dieser Technik gewonnenen Fluiditätsparameter (Mikroviskosität und Flußaktivierungsenergie) sollten immer im Zusammenhang mit der Methode als operationale Begriffe der Fluoreszenzpolarisationstechnik interpretiert werden.

3.3.1 Theoretischer Hintergrund der Fluoreszenzpolarisationstechnik

Das in die Lipidstruktur der Membran eingebettete fluoreszierende Agens wird mit linear polarisiertem Licht von einer Seite her angeregt. In einem rechten Winkel dazu wird dann die Fluoreszenzintensität bestimmt. Dabei wird einmal parallel zur Polarisationssebene ($I_{||}$) und einmal senkrecht dazu ($I_{\perp}$) gemessen. Aus diesen beiden Werten ergibt sich die Fluoreszenzpolarisation (P) und die Fluoreszenzanisotropie (r):

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} = \text{Fluoreszenzpolarisation}$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{2P}{3-P} = \text{Fluoreszenzanisotropie}$$

Über die Perrin-Gleichung läßt sich die Fluoreszenzpolarisation bzw. die Fluoreszenzanisotropie mit der Mikroviskosität der Umgebung des fluoreszierenden Agens in Zusammenhang setzen (Weber, 1953; Perrin, 1926).

In einem viskosen Medium ergibt sich durch das Wegdrehen des fluoreszierenden Agens während des angeregten Zustandes eine Erniedrigung der Fluoreszenzpolarisation bzw. Fluoreszenzanisotropie.

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{3\tau}{\rho}$$

r = Fluoreszenzanisotropie
 r_0 = Fluoreszenzanisotropie des unbeweglichen Fluoreszenzagens
 τ = Lebensdauer des Anregungszustandes
 ρ = Rotationsrelaxationszeit

Die Perrin-Gleichung ist von praktischem Wert bei einem maximalen Driftwinkel des fluoreszierenden Agens von 35°.

Dies entspricht ungefähr $r = r_0/2$.

Da die Rotationsrelaxationszeit proportional der absoluten Temperatur ist, kann die allgemeine Perrin-Gleichung auch auf diesen Parameter umgeschrieben werden:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + C(r) \frac{T \cdot \tau}{\bar{\eta}}$$

Dabei wird die Einheit der Viskosität im c.g.s.-System in Poise (dyne · s cm⁻²) angegeben. Der Kehrwert der Mikroviskosität entspricht der Fluidität $\phi = \frac{1}{\eta}$.

$C(r)$ ist ein Parameter, der die Molekülgröße mit der Beweglichkeit des fluoreszierenden Agens verbindet. Der Faktor $C(r) \cdot T \cdot \tau$ kann in einem

Modellsystem für ein bestimmtes fluoreszierendes Agens experimentell bestimmt werden.

Trägt man in einem Schaubild $(\frac{r_0}{r} - 1)^{-1}$ gegen $\bar{\eta}$ aus verschiedenen Literaturwerten auf, so ergibt sich eine Gerade mit der Steigung von $C(r)$
 $T \cdot \tau = 2,4$ Poise für die Diphenylhexatrien (DPH) als fluoreszierendes Agens. Die Fluoreszenzanisotropie des Diphenylhexatriens ergibt sich bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm $r_0 = 0,362$ (Shinitzky und Barenholz, 1978). Aus diesen Werten kann ein Näherungswert für die Mikroviskosität bestimmt werden:

$$\bar{\eta} = \frac{2,4 \cdot r}{0,362 - r} = \frac{2 P}{0,46 - P}$$

$$= \frac{I_{||}/I_{\perp} - 1}{0,73 - 0,27 \cdot I_{||}/I_{\perp}}$$

Bei der so bestimmten Mikroviskosität muß eine Schwankungsbreiten von $\pm 15\%$ beachtet werden. Die Mikroviskosität stellt dabei das geometrische Mittel aller beobachtbaren Mikroviskositäten entlang einer Achse dar:

$$\bar{\eta} = \sqrt[n]{\prod \eta} = \eta^{1/n}$$

Bestimmung der Flußaktivierungsenergie:

Die Viskosität einer Lösung aus linearen Molekülen nimmt mit der Temperatur exponentiell ab. Dies entspricht gut der empirischen Gleichung:

$$\eta = A \cdot e^{\Delta E/RT}$$

Der ΔE -Wert wird dabei als Flußaktivierungsenergie (Ewell, 1938) bezeichnet. Trägt man für ein einphasiges Lipidsystem über einem Tempe-

raturbereich $\log \eta$ gegen $1/T$ auf, so folgt aus der Steigung der Geraden die Flußaktivierungsenergie ΔE ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Die Flußaktivierungsenergie wird diskutiert als die kinetische Energie, die aufgebracht werden muß, um einen Fluß durch die Membran zu ermöglichen. Sie kann auch als die Energie interpretiert werden, die benötigt wird, um einen Hohlraum in einer Lipidschicht durch Zusammenlagern äußerer Lipidmoleküle zu bilden. Aus dieser Betrachtung wird anschaulich, daß die Flußaktivierungsenergie ΔE als Ordnungsparameter angesehen werden kann. Eine Erhöhung des Ordnungsgrades erniedrigt die Flußaktivierungsenergie ΔE .

Das Diphenylhexatrien (DPH) liegt normalerweise in einer stabilen all-trans-Konfiguration vor. Der angeregte Zustand läßt sich aber außer durch Fluoreszenz auch durch eine cis-trans Isomerisierung abbauen. Dies erniedrigt die Fluoreszenzintensität.

Das Diphenylhexatrien kann in einem wässrigen Medium dispergiert werden und bildet dann Mikroaggregate, die praktisch keine Fluoreszenz zeigen. Wird diese Dispersion mit einem lipidenthaltenden System vermischt, so lagert sich das Diphenylhexatrien gut in die hydrophoben Lipidbereiche ein und zeigt ein gutes Fluoreszenzsignal (Shinitzky und Barenholz, 1974).

3.3.2 Praktische Durchführung der Fluoreszenzpolarisationsbestimmung

a) Markierung der Membranen mit dem fluoreszierenden Agens

Von einer $1,3 \cdot 10^{-4}$ M-DPH/Acetonlösung werden 15 ml am Rotationsverdampfer abgedampft ($2 \cdot 10^{-6}$ Mol) und in 1 ml Tetrahydrofuran aufgenommen. Von dieser Lösung werden 100 μl in 100 ml eines Phosphatpuffers (10 mM, pH = 7,4) unter starkem Rühren schnell zugegeben. Dadurch läßt

sich eine gleichmäßige Verteilung des lipophilen DPH erreichen. Der Phosphatpuffer wurde vorher mit einem Milliporfilter von Partikelverunreinigungen gesäubert.

Die $2 \cdot 10^{-6}$ molare DPH/Phosphatpufferlösung kann, wenn sie im Dunkeln aufbewahrt wird, bis zu 3 Tagen verwendet werden. Die Thymozytenplasmamembranen (150 µg) wurden während 12 Stunden mit 2 ml DPH/Phosphatpufferlösung ($2 \cdot 10^{-6}$ M) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die lange Inkubationszeit war notwendig, da es sich gezeigt hat, daß sich bei kürzeren Inkubationszeiten keine konstanten Fluoreszenzsignale erhalten lassen.

Bei Änderung der Temperatur im Bereich von 12 - 40°C durchlief die Fluoreszenzpolarisation in unseren Versuchen bei kurzen Inkubationszeiten die Membran mit dem fluoreszierenden Agens eine Hysteresiskurve. Diese war reproduzierbar, d.h. sie wurde in aufeinanderfolgenden Temperaturzyklen in gleicher Weise beobachtet. Die Geschwindigkeit der Temperaturveränderung hatte dabei keine Bedeutung.

Solche Hysteresis-Erscheinungen wurden von verschiedenen Autoren in Anlehnung an ähnliche Vorgänge in der Physik (Ferromagnetismus oder Supraleitung) mit der Informationsspeicherung in biologischen Systemen in Verbindung gebracht (Träuble, 1971).

Das Hysterese-Verhalten wurde von uns nicht weiter untersucht, sondern durch 12stündige Inkubation der Membran mit dem fluoreszierenden Agens eliminiert. Die so erhaltenen Polarisationswerte bei verschiedenen Temperaturen waren gut reproduzierbar.

b) Messung der Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarisation wurde mit einem Fluoreszenzspektralphotometer der Firma Perkin Elmer (MPF-4) gemessen. Das Diphenylhexatrien

wurde bei einer Wellenlänge von 361 nm angeregt. Die Emmission erfolgte bei einer Wellenlänge von 427 nm. Die Spaltbreite des Anregungslichtes wurde sehr eng gewählt (0,45 nm), um photochemische Reaktionen des Diphenylhexatriens möglichst klein zu halten. Die Temperaturzunahme bzw. -abnahme wurde auf 1,5°C/min eingestellt. Dabei wurde der Temperaturbereich von 12°C - 40°C jeweils zweimal durchlaufen.

Die Auswertung erfolgte auf die im theoretischen Teil besprochene Weise.

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluß von Lysophosphatidylcholin und acyliertem Lysophosphatidylcholin auf die Mg^{2+} -ATPase von Kalbsthymozytenplasmamembranen

Der Einfluß verschiedener Fettsäuren in der Phosphatidylcholinfraktion von Thymozytenplasmamembranen auf Enzymaktivitäten sollte dadurch geklärt werden, daß in Vorversuchen exogen zugegebenes Lysophosphatidylcholin mit Acyl-CoA durch eine in der Membran vorhandene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase acyliert wird.

Da Lysophosphatidylcholin Detergenzeigenschaften zeigt, mußte untersucht werden, in welchem Konzentrationsbereich sich die Thymozytenplasmamembranen durch Lysophosphatidylcholin solubilisieren lassen. Auf Grund dieser Detergenzwirkung besteht die Gefahr, daß die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase bei hoher Substratkonzentration ihre Aktivität verliert und so eine Acylierung des Lysophospholipids verhindert wird.

4.1.1 Wirkung hoher Lysophosphatidylcholinkonzentrationen auf die Solubilisierung von Thymozytenplasmamembranen

Die Thymozytenplasmamembranen wurden mit 10 mM-HEPES, pH = 7,4 vor der Inkubation mit radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin nochmals gewaschen. Die Inkubation der Membranen erfolgte bei einer Konzentration von 2,4 μ Mol - 6,3 μ Mol Lysophosphatidylcholin pro mg Protein. Die Inkubationsdauer betrug 20 Minuten. Danach wurden die Membranen abzentrifugiert. Das Sediment und die Überstände wurden getrennt untersucht. Die Proteinwerte wurden nach der Ninhydrinmethode (s. Methodik) bestimmt. Die Lysophosphatidylcholinverteilung ergab sich aus dem Ver-

gleich der Radioaktivität im Sediment und Überstand. Die Ausbeute an wiedergefundenem Lysophosphatidylcholin betrug 97,8%, die Proteinausbeute ergab 76,0%. Abbildung 4.1.1 zeigt, dass die Verteilung des Lysophosphatidylcholins auf Sediment und Überstand der Verteilung des Proteins entspricht. Dies läßt sich durch eine direkte Bindung des Lysophosphatidylcholins an die Membranvesikel erklären. Das Lysophosphatidylcholin tritt aus der wässrigen Phase in die Membranvesikel. Da die Lysophosphatidylcholinverteilung die Proteinverteilung widerspiegelt, kann eine präferenzielle Bindung in bestimmten Membranarealen ausgeschlossen werden. Dies läßt die Acylierung des exogen zugegebenen Lysophosphatidylcholins durch Acyl-CoA als möglich erscheinen.

4.1.2 Verteilung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase und Mg^{2+} -ATPase auf Sediment und Überstand nach Inkubation mit Lysophosphatidylcholin

Nachdem gezeigt worden war, daß sich große Mengen an Protein mit Hilfe von Lysophosphatidylcholin solubilisieren lassen, wurde die Verteilung der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase auf Überstand und Sediment untersucht. Bei 2,4 μ Mol Lysophosphatidylcholin/mg Protein waren 54% bei 6,3 μ Mol Lysophosphatidylcholin/mg Protein waren 84% der Enzymaktivität solubilisiert.

Die Mg^{2+} -ATPase wurde durch Inkubation mit Lysophosphatidylcholin ebenfalls teilweise aus der Membran gelöst. Im Gegensatz zu Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholintransferase wurde für die Mg^{2+} -ATPase eine starke Hemmung der spezifischen Aktivität bei der Zugabe größerer Mengen von Lysophosphatidylcholin gemessen (Tabelle 4.1.1). Bei einer Lysophosphatidylcholinkonzentration von 3,6 μ Mol/mg Protein wurde nur noch 44% der

Solubilisierung von Thymozytenplasmamembranen nach Behandlung mit
Lysophosphatidylcholin

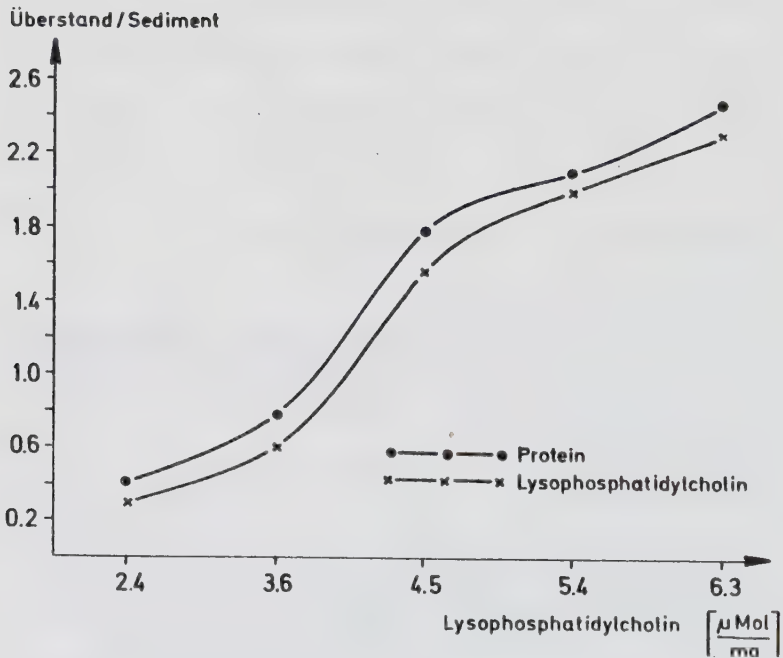


Abb. 4.1.1

Thymozytenplasmamembranen wurden zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen und danach in demselben Puffer mit steigenden Konzentrationen von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin (2,4 - 6,3 $\mu\text{Mol} / \text{mg}$ Protein) inkubiert und nach 20 Minuten zentrifugiert.

Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase nach Inkubation mit Lysophosphatidylcholin

Lyso-PC μ Mol/mg Prot.	Überstand		Sediment		Summe
	spez. Aktivität (nMol/mg $\cdot$ min)	Gesamtaktivität (nMol/min)	Spez. Aktivität (nMol/mg min)	Gesamtaktivität (nMol/min)	
0,0	0,0	0,0	30,7	9,9	100
2,4	11,7	1,6	25,1	7,4	75
3,6	15,7	3,3	5,4	4,3	44
4,5	15,1	3,9	2,3	4,2	43
5,4	15,8	4,0	4,8	4,6	47
6,3	7,7	2,1	1,6	2,4	24

* Lyso-PC = Lysophosphatidylcholin

Tabelle 4.1.1

Ausgangsenzymaktivität in Überstand und Sediment gefunden. Davon ließen sich 75% nicht mehr mit der Ultrazentrifuge sedimentieren.

4.1.3 Acylierung von exogen zugegebenem Lysophosphatidylcholin

Die Aktivitätsverteilung der Mg^{2+} -ATPase und Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase ließ die Möglichkeit offen, Acylierungsversuche sowohl mit dem Überstand als auch mit dem Sediment auszuführen. Zu einem Aliquot von beiden Fraktionen wurde eine mit der Lysophosphatidylcholinkonzentration stöchiometrische Menge Arachidonoyl-CoA zugesetzt, 60 Minuten inkubiert und über die radioaktive Verteilung der Einbau der Arachidonsäure gemessen. Sowohl in Überstand wie im Sediment war der Einbau von Arachidonsäure in Lysophosphatidylcholin nicht überzeugend (Tabelle 4.1.2).

Acylierung von exogenem Lysophosphatidylcholin im Sediment und Überstand

$\mu\text{Mol-Lyso-PC}$ /mg Protein	2,4	3,6	4,5	5,4	6,3	
Überstand	58,9	26,2	29,8	31,2	17,6	% PC aus Lyso-PC
Sediment	22,2	7,1	6,5	10,5	8,3	% PC aus Lyso-PC

Tab. 4.1.2 Radioaktiv markiertes Lyso-PC wurde während 60 Minuten mit Thymozytenplasmamembranen und Arachidonoyl-CoA bei 37°C inkubiert. Danach wurde aus der Verteilung der Radioaktivität auf PC und Lyso-PC die prozentuale Acylierung des Lyso-PC bestimmt.

Lyso-PC = Lysophosphatidylcholin

PC = Phosphatidylcholin

Die nur teilweise befriedigenden Acylierungsergebnisse mögen einerseits auf die hohe Lysophosphatidylcholkonzentration zurückführbar sein. Andererseits muß auch ein Detergenzeffekt des Arachidonoyl-CoA diskutiert werden. Die Mg^{2+} -ATPase war in allen Proben nach Zugabe von Arachidonoyl-CoA inaktiviert. Die prozentuale Acylierung lag bei niedrigen Lysophosphatidylcholkonzentrationen (2,4 μ Mol/mg Protein) im Überstand am höchsten (58,9%). Bei dieser Konzentration war die Gesamtmenge an solubilisierter Membran mit 29% aber gering (s. Fig. 4.1.1).

Die oben dargestellten Versuche zeigten:

1. hohe Lysophosphatidylcholkonzentrationen hemmen die Mg^{2+} -ATPase (s.Tab. 4.1.1)
2. hohe Lysophosphatidylcholin- und Arachidonoyl-CoA-Konzentrationen inaktivieren die Mg^{2+} -ATPase.
3. Die Acylierung von Lysophosphatidylcholin mit Arachidonoyl-CoA zeigt bei niedrigen Substratkonzentrationen bessere Ausbeuten.
4. Bei Zugabe von niedrigen Lysophosphatidylcholin- und Arachidonoyl-CoA-Konzentrationen ist die Ausbeute der Acylierungsreaktion im Überstand höher als im Sediment. Bei niedriger Substratkonzentration ist der prozentuale Anteil des Überstandes an Thymozytenmembranen jedoch gering.

Dies zeigt, daß erfolgreiche Acylierungsexperimente bei niedriger Substratkonzentration mit dem Sediment durchgeführt werden müssen. In den folgenden Versuchen sollte die Substratkonzentration durch sukzessive Zugabe von Arachidonoyl-CoA in halbstöchiometrischer Konzentration in Bezug auf Lysophosphatidylcholin erniedrigt werden.

Zur Klärung des Einflusses von Acylierungsprodukten des Lysophosphatidylcholins auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase wurden 1,6 μ Mol

Lysophosphatidylcholin/mg Protein auf vorher gewaschene Thymozytenplasmamembranen gegeben. Eine Hälfte wurde zentrifugiert und sowohl Überstand wie Sediment getrennt untersucht. Zu einem Aliquot der verschiedenen Proben wurde eine halbstöchiometrische Menge an Arachidonoyl-CoA über 2 Stunden im 20 Minuten-Rhythmus zugegeben. Dadurch sollte die lokale Konzentration an Arachidonoyl-CoA während der Reaktion vermindert werden. Nach der Zugabe des Substrats wurde noch 40 Minuten weiter inkubiert. Der Einbau von Arachidonsäure wurde über die Verteilung der Radioaktivität auf Lysophosphatidylcholin und Phosphatidylcholin gemessen. Bei allen Proben war 50% des Lysophosphatidylcholins in Phosphatidylcholin überführt worden. Restliches Arachidonoyl-CoA war folglich nicht mehr in den Proben vorhanden.

Bei dieser Versuchsführung war die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase erniedrigt, aber noch vorhanden (Tabelle 4.1.3).

Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase nach Zugabe von Lysophosphatidylcholin und Arachidonoyl-CoA

	Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase (nMol/mg) · min)		Rest- akti- vität %
	mit Lyso-PC	mit Lyso-PC+Arach-CoA	
Probe unzentri- fugiert	39,7	34,8	87,7
Sediment	24,8	21,0	84,8
Überstand	23,4	18,4	78,8

Tab. 4.1.3 Thymozytenplasmamembranen wurden mit 1,6 µMol/mg Lyso-PC versetzt und mit der halbstöchiometrischen Menge Arachidonoyl-CoA während 3 Stunden inkubiert. Die Restaktivität (%) bezieht sich auf die Aktivitätserniedrigung durch Einbau von Arachidonsäure. Die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase von unbehandelten Membranen betrug 42,2 nMol/mg min. Arach-CoA = Arachidonoyl-CoA

Die Restaktivität der Mg^{2+} -ATPase wurde durch den Einbau der Arachidonsäure bei allen Proben um 15 - 20% erniedrigt.

Bei weiteren Versuchen sollten höhere Einbauraten der Arachidonsäure in exogen zugegebenes Lysophosphatidylcholin bei gleicher Versuchsführung erreicht werden.

Thymozytenplasmamembranen wurden dazu mit verschiedenen Lysophosphatidylcholinkonzentrationen (2,4 μ Mol/mg Protein; 3,6 μ Mol/mg Protein; 4,5 μ Mol/mg Protein) versetzt. Das Arachidonoyl-CoA wurde im 10 Minuten-Rhythmus bis zur stöchiometrischen Konzentration gegenüber Lysophosphatidylcholin zugesetzt. Nach 50%, 75% und 100% Arachidonoyl-CoA-Zugabe wurde ein Aliquot entnommen. Von diesen Proben wurde der Einbau der Arachidonsäure in das Lysophospholipid und die spezifische Aktivität der Mg^{2+} ATPase bestimmt. Die durch diese Probenentnahme fehlenden Teile wurden bei der Zugabe von weiterem Arachidonoyl-CoA und bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt. Die Proben wurden insgesamt während 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Einbaurrate von Arachidonsäure war bei dieser Versuchsführung nicht befriedigend. Bei allen Proben waren maximal 55% des Lysophosphatidylcholins umgesetzt. Die Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit Arachidonoyl-CoA und hohen Lysophosphatidylcholinkonzentrationen ergab eine starke Erniedrigung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase (Tabelle 4.1.4).

4.4.1 Optimale Acylierung von exogenem Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen

Niedrigere Lysophosphatidylcholinkonzentrationen wie in den vorigen Versuchen (0,6 μ Mol/mg Protein; 1,2 μ Mol/mg Protein; 1,8 μ Mol/mg Protein)

Wirkung der Acylierung von exogenem Lysphosphatidylcholin auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase

Zugabe von Arach-CoA	00%	50%	75%	100%	(% der stöchiometrischen Menge)
$\mu\text{Mol-L-lyso-PC/mg Protein}$	$\text{nMol/mg} \cdot \text{min}$	$\text{nMol/mg} \cdot \text{min}$	$\text{nMol/mg} \cdot \text{min}$	$\text{nMol/mg} \cdot \text{min}$	
0,0	58,8	-	-	-	
2,4	22,7	18,0	12,6	11,9	
3,6	18,1	6,4	3,4	3,0	
4,5	15,0	5,1	2,7	1,7	

Tab. 4.1.4

Arach-CoA = Arachidonoyl-CoA
 Lyso-PC = Lysophosphatidylcholin

sollten eine geringere Hemmung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase bei Inkubation mit Arachidonoyl-CoA bewirken. Für diese Versuchsführung wurde auch eine höhere relative Einbaurrate von Arachidonsäure in das Lysophosphatidylcholin erwartet. Dies wurde durch die Versuchsergebnisse bestätigt. Eine Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit 1,2 μ Mol Lysophosphatidylcholin/mg Protein ergab keine Erniedrigung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase. Eine solche Erniedrigung wurde erst bei dem Einbau größerer Mengen an Arachidonsäure beobachtet (Tabelle 4.1.5).

Die maximale Einbaurrate von Arachidonsäure in das exogene Lysophosphatidylcholin betrug 80%. Höhere Acylierungsraten konnten auch bei anderen Einbau- bzw. Markierungsexperimenten mit Arachidonoyl-CoA nicht erzielt werden.

Wie aus den hier dargestellten Experimenten hervorgeht, hat die Zugabe von exogenem Lysophosphatidylcholin bzw. die Acylierung dieses Lysophosphatidylcholins immer eine Hemmung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase zur Folge. Die Einführung von Fettsäuren durch Acylieren von exogenem Lysophosphatidylcholin in der Thymozytenplasmamembran erhöht das Lipid/Proteinverhältnis und kann dadurch schon für die Hemmung der Mg^{2+} -ATPase verantwortlich sein.

Die biochemische Bedeutung der verschiedenen Fettsäuren auf die Aktivität von Enzymen der Thymozytenplasmamembran sollte durch einen direkten Austausch der Fettsäuren in Membranphospholipiden besser bestimmt werden können. Auf diese Weise lassen sich möglicherweise auch die annulären Lipide der membrangebundenen Enzyme erreichen. Die annulären Lipide haben eine große Bedeutung bei der Regulation von Enzymaktivitäten (s. Einleitung).

Spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase nach optimaler Acylierung von exogenem Lysophosphatidylcholin

Zugabe von Arach-CoA (% der stöchiometrischen Menge)	00%	50%	75%	100%
$\mu\text{Mol-L-ysc-PC/mg Protein}$	nMol/ Einbau- $\text{mg} \cdot \text{min rate}$	nMol/ Einbau- $\text{mg} \cdot \text{min rate}$	nMol/ Einbau- $\text{mg} \cdot \text{min rate}$	nMol/ Einbau- $\text{mg} \cdot \text{min rate}$
0,0	75,1	-	-	-
0,6	72,2	-	70,8	50% 67,4 67% 38,0 78%
1,2	70,7	-	70,3	50% 46,2 72% 31,2 82%
1,8	33,5	-	22,9	50% 18,0 57% 12,0 58%

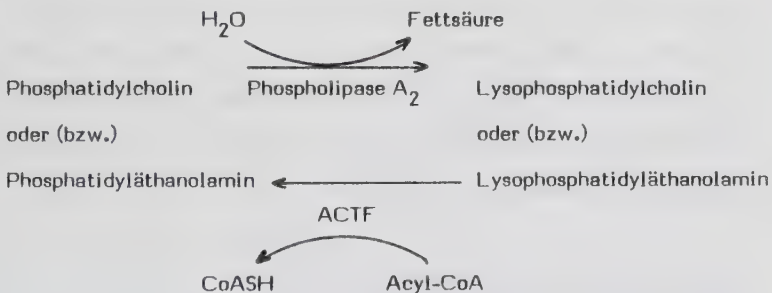
Tab. 4.1.5

Zu Thymozylplasmamembranen wurden steigende Konzentrationen von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin (0,0 - 1,8 $\mu\text{Mol/mg Protein}$) zugesetzt.

Diese wurden mit 50%, 75% und 100% der stöchiometrischen Menge an Arachidonoyl-CoA versetzt und 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Einbaureate bezieht sich auf den prozentualen Anteil von acyliertem Lysophosphatidylcholin nach der Reaktion.

4.2. Hydrolyse der Membranphospholipide mit Hilfe von Phospholipase A₂

Die Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin lassen sich mit Hilfe von Phospholipase A₂ in die entsprechenden Lysophospholipide überführen. Dabei wird die Fettsäure in Stellung 2 abgespalten. Die hydrolytisch abgebauten Phospholipide sollten in einem zweiten Reaktionsschritt mit Hilfe einer in der Thymozytenplasmamembran lokalisierten Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase wieder acyliert werden.



ACTF = Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase

4.2.1 Spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase von Phospholipase A₂ behandelten Thymozytenplasmamembranen

Gleiche Mengen Thymozytenplasmamembranen (250 µg) wurden mit steigenden Mengen Phospholipase A₂ (0-21,6 nMol/min) 10 Minuten mit Ca²⁺ (3 mM) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 mM-HEPES, pH = 7,4, war in einem Vorversuch kein weiterer Abbau von Phospholipiden zu beobachten. Dies zeigt, daß die Phospholipase A₂ sich durch Waschen wieder entfernen läßt. Die resuspendierten Proben wurden auf die spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase und γ-Glutamyltransferase untersucht. Die Hydrolyse der Phospholipide wurde über die Bestimmung des Lipidphos-

phorgehaltes nach Gerlach-Deuticke (s. Methodik) verfolgt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der ATPase wurde mit und ohne Ouabain (1 mM) durchgeführt. Die durch Ouabain hemmbare Aktivität der Gesamt-ATPase entspricht dem Anteil der Na^+ , K^+ -ATPase (s. Methodik). Eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase wurde bei unseren Versuchen nicht gefunden. (Abb.4.2.1). Die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase stieg im Lauf der Inkubation der Thymozytenplasmamembran mit Phospholipase A_2 auf das Doppelte an. Da Sphingomyelin von Phospholipase A_2 nicht hydrolysiert wird, kann es genau so wie Cholesterin und Protein als interner Standard verwendet werden. Während dem enzymatischen Abbau der Phospholipide blieb das Gesamtphospholipid/Sphingomyelinverhältnis konstant. Erst bei hohen Abbauraten nahm dieses Verhältnis etwas ab (Tabelle 4.2.1).

Abbau von Phospholipiden mit Phospholipase A_2

Phospholipase A_2 (nMol/min)	0.0	1.3	2.7	5.4	10.8	21.6
Phosphatidylcholin	100%	79%	59%	54%	40%	34%
Phosphatidyl- äthanolamin	100%	60%	58%	48%	29%	25%
Gesamtphospholipid	100%	95%	92%	90%	84%	79%

Tab. 4.2.1 Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die unbehandelten Thymozytenplasmamembranen. Die Werte wurden über das Phospholipid/Sphingomyelinverhältnis bestimmt.

Die Aktivität der γ -Glutamyltransferase lag unverändert bei allen Proben nach dem Phospholipase- A_2 -Abbau bei $36,5 \pm 2$ nMol/mg · min.

Aktivierung der Gesamt-ATP'ase durch Inkubation der Thymozytenplasma-
membranen mit Phospholipase A₂

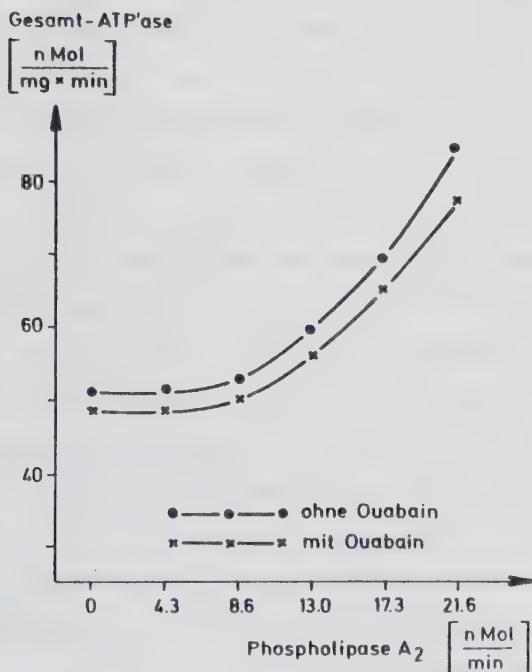


Abb. 4.2.1

Thymozytenplasmamembranen wurden mit steigenden Phospholipase A₂-Konzentrationen (0 - 21,6 nMol/min po 250 µg Protein) und Ca²⁺ (3 mM) während 10 Minuten inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) ließ sich die Phospholipase A₂ wieder entfernen.

4.2.2 Bestimmung der Fluidität von Thymozytenplasmamembranen nach Behandlung mit Phospholipase-A₂

Die Temperaturabhängigkeit der Mikroviskosität von Thymozytenplasmamembranen nach Phospholipase-A₂-Behandlung ergab sich aus der Messung der Fluoreszenz-Polarisation mit DPH (Diphenylhexatrien, s. Methodik). Die Flußaktivierungsenergie, welche sich aus der Steigerung des $\ln \bar{\eta} / (1/T)$ bestimmen läßt, ($\bar{\eta}$ = Mikroviskosität), wurde durch die Inkubation der Membranen mit Phospholipase-A₂ nicht beeinflußt und behielt den Wert 5,7 kcal/Mol. Die Mikroviskosität der Membran stieg bei dem hydrolytischen Abbau der Phospholipide kontinuierlich an (Abb. 4.2.2). Der Anstieg der Mikroviskosität läßt sich direkt über den Acylierungsgrad von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylcholin mit dem Abbau dieser Phospholipide linear korrelieren (Abb. 4.2.3). Der Acylierungsgrad der Phospholipide wurde aus der prozentualen Acylierung der Phosphatidylcholin/Lyso-phosphatidylcholin- und Phosphatidyläthanolamin/Lyso-phosphatidyläthanolaminfraktion bestimmt. Da der Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamingehalt der Membran sich unterscheidet, mußten für die Berechnung des zusammengefaßten Acylierungsgrades die Mengenverhältnisse beachtet werden. Das Phosphatidylcholinverhältnis wurde mit 2/3, das Phosphatidyläthanolaminverhältnis mit 1/3 gewichtet.

4.2.3 Spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase von Phospholipase-A₂ behandelten Thymozytenplasmamembranen nach Inkubation mit Rinderserumalbumin

Hasselbach et al. fanden bei ihren Untersuchungen, daß mit Rinderserumalbumin gewaschene Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel nach vorherigem Behandeln mit Phospholipase-A₂ ihre ATPase-Aktivität verlieren (Fiehn, Hasselbach, 1970). Dieses Verhalten

Mikroviskosität von Thymozytenplasmamembranen nach Inkubation mit Phospholipase A₂

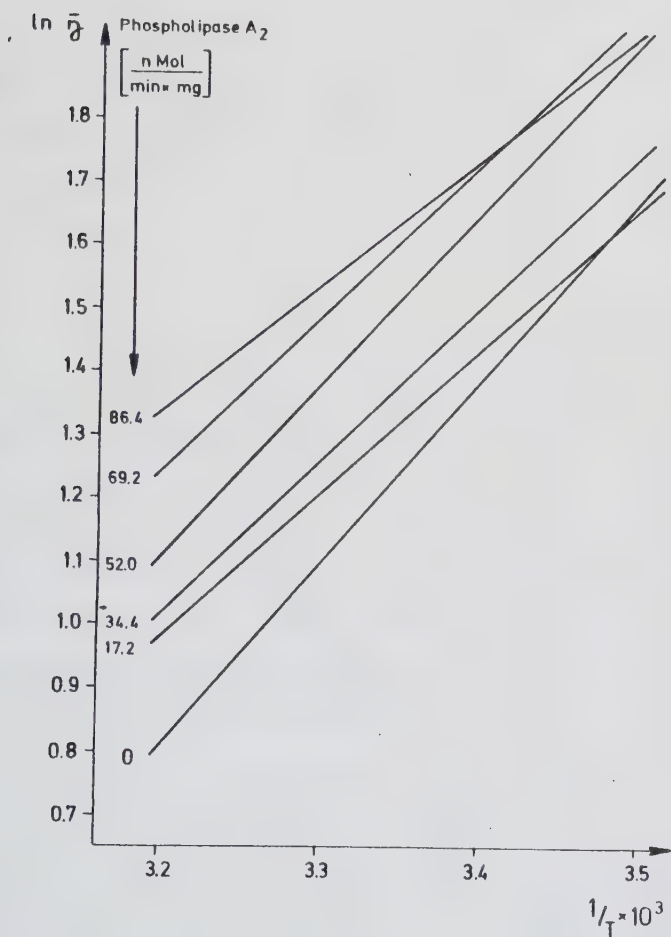


Abb. 4.2.2

Thymozytenplasmamembranen wurden mit steigenden Phospholipase A₂ Konzentrationen (0 - 86,4 nMol/min pro mg Protein) 10 Minuten inkubiert. Inkubationspuffer: 10 mM-HEPES (pH = 7,4; Ca²⁺ = 3 mM). Nach der Inkubation wurden die Membrane zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH 7,4) gewaschen. Die Mikroviskosität wurde über die Fluoreszenzpolarisation mit DPH bestimmt.

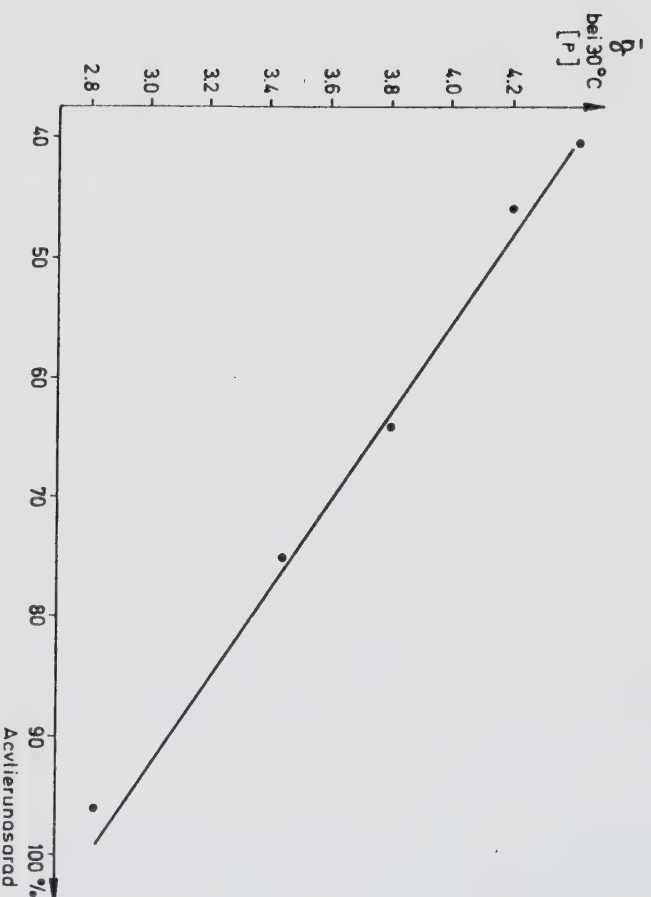


Abb. 4.2.3

Thymozytenplasmamembranen wurden mit steigenden Phospholipase A_2 Konzentrationen (0 - 86,6 nMol/min pro mg Protein) 10 Minuten mit Ca^{2+} (3 mM) inkubiert und danach mit HEPES-Puffer zweimal gewaschen. Die Mikroviskosität der Membran wurde über die Fluoreszenzpolarisation mit DPH bestimmt. Der Acylierungsgrad ergibt sich aus den gewichteten Acylierungsgraden des Phosphatidylcholins und Phosphatidyläthanolamins.

konnte bei gleicher Behandlung der Thymozytenplasmamembranen in unseren Versuchen nicht gefunden werden (Abb. 4.2.4). In einer Versuchsreihe mit einer hohen Phospholipase-A₂-Konzentration konnte gezeigt werden, daß sogar bei einem restlichen Lipidgehalt von 70 nMol/mg Protein (d.h. 10% des Ausgangslipidgehaltes) die Mg²⁺-ATPase eine Steigerung der Aktivität auf 180% gegenüber den unbehandelten Membranen zeigt. Der Abbau der Membranphospholipide wurde nach der Methode von Gerlach-Deuticke bestimmt (Abb. 4.2.5).

In weiteren Versuchen wurden Thymozytenplasmamembranen mit steigenden Phospholipasekonzentrationen inkubiert und danach mit konstanter Rinderserumalbuminkonzentration (5%) zweimal gewaschen. Durch Behandeln der Membranen mit Rinderserumalbumin lassen sich die Hydrolyseprodukte (Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidyläthanolamin, Fettsäuren) der Phospholipase-A₂-Behandlung aus der Membran entfernen (Fiehn und Hasselbach, 1970). Bei diesen Versuchen wurde der hemmende Einfluß der Lipide auf die Mg²⁺-ATPase besonders deutlich (Abb. 4.2.6). Nach dem Waschen der Membranen mit Rinderserumalbumin konnte kein Lysophosphatidylcholin in der Membran mehr nachgewiesen werden.

Bei der Hydrolyse der Phospholipide mit Phospholipase-A₂ und dem Waschen der Plasmamembranen mit Rinderserumalbumin bleibt das Cholesterin in der Membran zurück und kann (genau so wie Protein und Sphingomyelin) als interner Standard gelten. Von den verschiedenen Proben nach Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit steigenden Phospholipase-A₂-Konzentrationen und Waschen mit 5% Rinderserumalbumin (Abb. 4.2.6) wurde das Phospholipid/Cholesterinverhältnis bestimmt und in Beziehung zur Mg²⁺-ATPase-Aktivität gesetzt (Abb. 4.2.7). Erniedrigt sich das Phospholipid/Cholesterinverhältnis, so steigt die spezifische Aktivität

Eliminierung der Hydrolyse-Produkte nach Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit Phospholipase A₂ durch Waschen mit Rinderserumalbumin

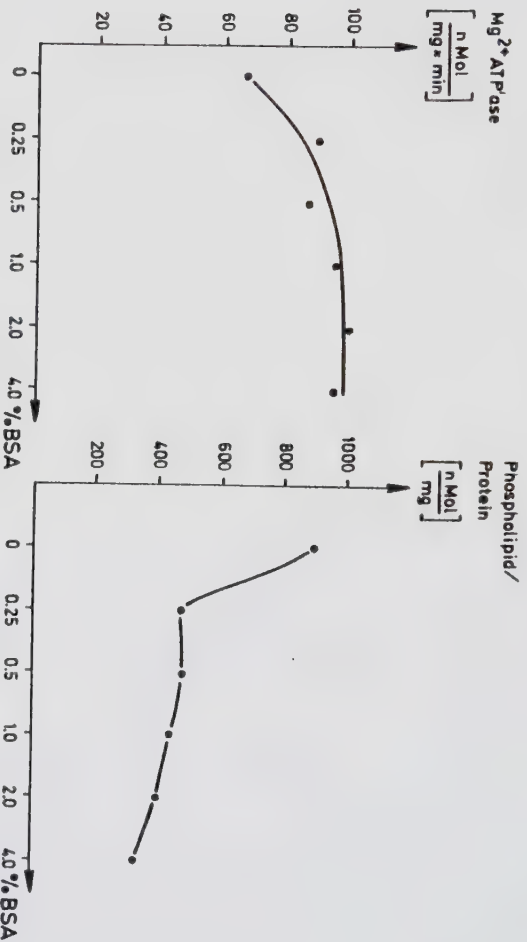


Abb. 4.2.4

Abb. 4.2.5

Thymozytenplasmamembranen wurden mit Phospholipase A₂ (84 nMol/min pro mg Protein) und Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Membranen mit Rinderserumalbumin (BSA; 0 - 4%) gewaschen. Das Rinderserumalbumin wurde durch zweimaliges Waschen der Membranen mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) wieder entfernt.

Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase durch Inkubation mit Phospholipase A_2 und Waschen mit Rinderserumalbumin

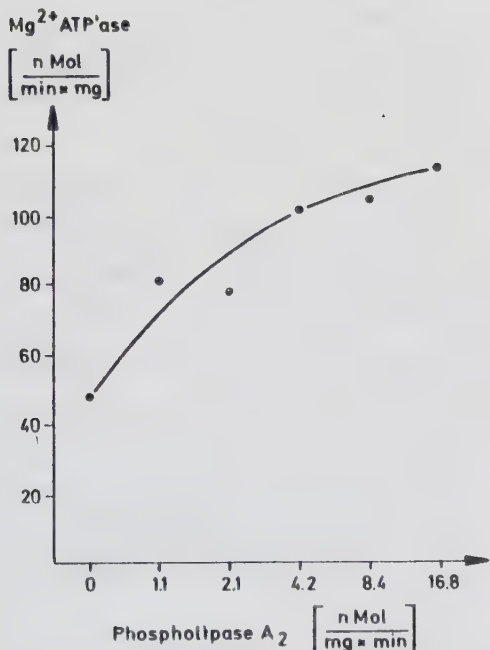


Abb. 4.2.6

Thymozytenplasmamembranen wurden mit steigenden Phospholipase A_2 -Konzentrationen und Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten inkubiert und danach mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4, % BSA) gewaschen. Das Rinderserumalbumin wurde durch zusätzliches Waschen mit HEPES-Puffer wieder entfernt. Danach ließ sich kein Lysophosphatidylcholin mehr in der Membran nachweisen.

Abhängigkeit der Mg^{2+} -ATPase vom Phospholipid/Cholesterinverhältnis der Thymozytenplasmamembranen

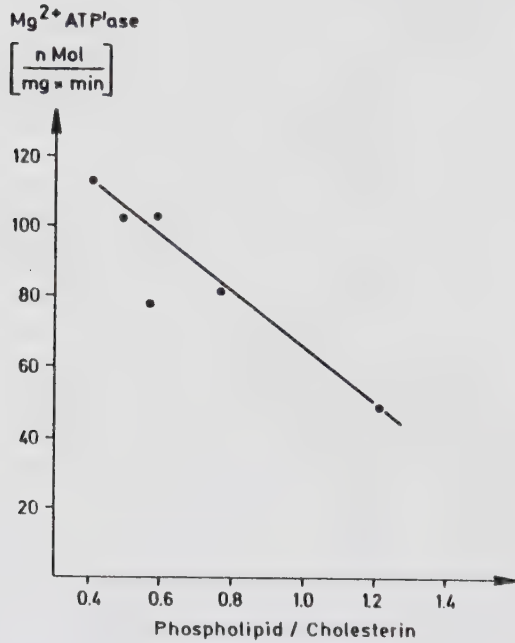


Abb. 4.2.7

Die Mg^{2+} -ATPase-Aktivität der Membranen aus Abb. 4.2.6 wurde mit dem Phospholipid/Cholesterinverhältnis in Beziehung gesetzt. Dieses Verhältnis bestimmt die Mikroviskosität der Membran.

der Mg^{2+} -ATPase linear an. Cooper et al (1978) verbinden mit einem abnehmenden Phospholipid/Cholesterinverhältnis eine lineare Erhöhung der Mikroviskosität der Membran.

4.3 Umacylierung der Membranphospholipide in einem Reaktionsschritt

Die in der Thymozytenplasmamembran vorhandene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase sollte in einer gekoppelten Reaktion mit der Phospholipase- A_2 in der Lage sein, das gebildete Lysophosphatidylcholin bzw. Lysophosphatidyläthanolamin wieder mit Hilfe von Acyl-CoA zu reacylieren. Die gekoppelte Reaktion führt im Endeffekt zu einer Umacylierung, durch die Fettsäuren in den Membranphospholipiden ausgetauscht werden können. Die spezifische Aktivität der eingesetzten Phospholipase- A_2 muß dabei kleiner sein als die Enzymaktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase. Bei einem Einsatz einer zu hohen Phospholipase- A_2 -Konzentration würde sich Lysophosphatidylcholin in der Membran anreichern und sich einer Reacylierung entziehen. Die optimalen Bedingungen für dieses Verfahren sollten empirisch ermittelt werden.

4.3.1 Acylierung von endogen gebildetem Lysophosphatidylcholin nach Inkubation mit Phospholipase- A_2

Die Aktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase kann in einem optischen Test bestimmt werden (s. Methodik). Mit diesem Test kann über die Bildung von CoASH untersucht werden, wieviel endogen gebildetes Lysophosphatidylcholin mit Hilfe von Acyl-CoA acyliert wird. Thymozytenplasmamembranen (50 µg), 50 µl DTNB (10 mM), 100 nMol Arachidonoyl-CoA, 35 µl $CaCl_2$ (0,1 M), 10 nMol/min Phospholipase- A_2 wurden mit einem

10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,2, auf 1 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde gut gemischt und in einer 1ml-Quarzküvette inkubiert. Aus der Extinktionssteigerung der Lösung bei 405 nm ergab sich die spezifische Aktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase. Diese Aktivität betrug für dieses System mit endogener Substratbildung 9,8 nMol/mg · min. Die Aktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase erniedrigte sich bei Zusatz von 70 µl EDTA (0,1 M) auf den Nullwert. Das EDTA komplexiert die für die Aktivität der Phospholipase-A₂ notwendigen Ca²⁺-Ionen. Dadurch wird die Freisetzung des Lysophosphatidylcholins aus Phosphatidylcholin verhindert. Zur Kontrolle wurden nach dieser Hemmung der spezifischen Aktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase exogen Substrat zugegeben. Bei einem Zusatz von 200 nMol Lysophosphatidylcholin ergab sich mit 38,0 nMol/mg · min die spezifische Aktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase von unbehandelten Thymozytenplasmamembranen.

Es konnte so gezeigt werden, daß eine direkte Acylierung von endogen gebildetem Lysophosphatidylcholin über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase prinzipiell möglich ist.

4.3.2 Bestimmung der Einbaurrate von Arachidonsäure in endogen gebildetes Lysophosphatidylcholin

Nachdem gezeigt wurde, daß endogen gebildetes Lysophosphatidylcholin über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase acyliert werden kann, sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß eine solche Acylierung durchführbar ist.

Thymozytenplasmamembranen wurden mit radioaktivem Phosphatidylcholin markiert und anschließend mit Phospholipase-A₂ inkubiert. Zu einem Teil

der Versuchsansätze wurde gleichzeitig Arachidonoyl-CoA zugesetzt. Die für gute Reacylierungswerte optimale Phospholipase-A₂-Konzentration sollte so experimentell ermittelt werden. Die Versuche wurden mit verschiedenen Phospholipase-A₂-Konzentrationen und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt (s. Abb. 4.3.1).

Wird Arachidonsäure aus Arachidonoyl-CoA in die Membranphospholipide eingebaut, so dürfte sich nur wenig radioaktiv markiertes Lysophosphatidylcholin aus dem radioaktiv markierten Phosphatidylcholin bilden. Die Zunahme von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin in der Membran weist auf nicht acyliertes endogen gebildetes Lysophosphatidylcholin hin.

Die radioaktive Markierung der Phosphatidylcholinfraktion der Thymozytenplasmamembran erfolgte durch Acylierung von exogenem Lysophosphatidylcholin mit Arachidonoyl-CoA vor der Inkubation der Membranen mit Phospholipase-A₂. Nach der radioaktiven Markierung ließen sich 75% der Radioaktivität in der Phosphatidylcholinfraktion nachweisen. Durch die Inkubation mit Phospholipase-A₂ und Arachidonoyl-CoA sollte sich das Acylierungsverhältnis möglichst nicht erniedrigen. Ein gleichbleibendes Acylierungsverhältnis beschreibt ein Gleichgewicht zwischen Hydrolyse der Phospholipide durch Phospholipase-A₂ und Acylierung der Lysophospholipide durch die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase. Trotz Variation der verschiedenen Versuchsparameter ließ sich dieses Ziel nicht erreichen (Abb. 4.3.1). Auch bei niedriger Phospholipase-A₂-Konzentration übertraf die Hydrolysereaktion die Acylierungsreaktion. Die Verteilung der Radioaktivität verschob sich während der Inkubation der Membranen mit Phospholipase-A₂ und Arachidonoyl-CoA immer weiter auf die Seite der Lysophosphatidylcholinfraktion.

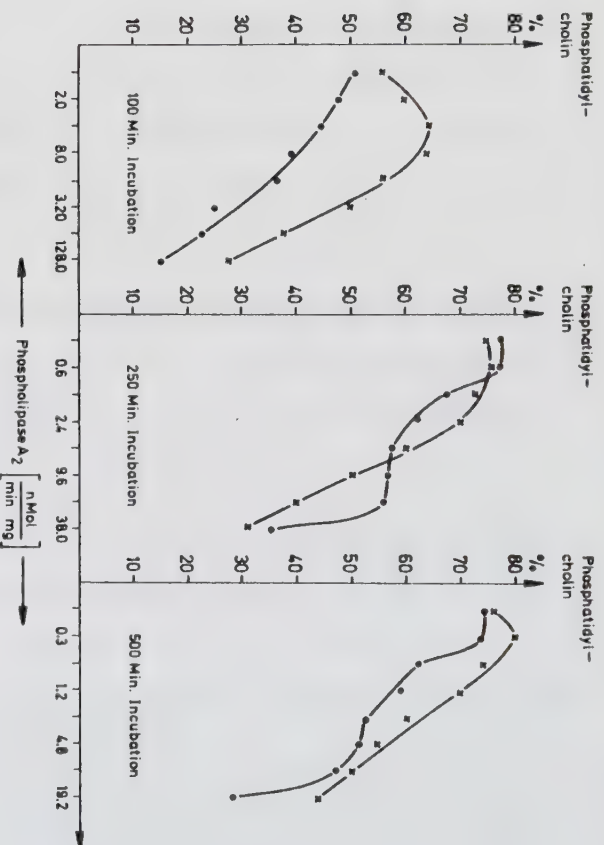


Abb. 4.3.1

Thymozytenplasmamembranen wurden mit radioaktiv markiertem Lyso-phosphatidylcholin und Arachidonoyl-CoA (jeweils 30 nMol/mg Protein) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Lyso-phosphatidylcholin wurde dabei zu 75% enzymatisch in Phosphatidylcholin überführt. Diese Membranen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Phospholipase A_2 (0 - 128 nMol/min pro mg Protein) und Arachidonoyl-CoA (500 nMol/mg Protein) inkubiert. Die Deacylierung bzw. Reacylierung des Phosphatidylcholins wurde über die Verteilung der Radioaktivität auf die Lyso-phosphatidylcholin- bzw. Phosphatidylcholinfraktion nach Extraktion der Lipide untersucht.

Bei Inkubation der Membranen mit Arachidonoyl-CoA zeigte der Abbau des radioaktiven Phosphatidylcholins eine lineare Abhängigkeit mit der Phospholipase-A₂-Konzentration. Ohne Arachidonoyl-CoA zeigten sich bei längeren Inkubationszeiten und niedrigen Phospholipase-A₂-Konzentrationen Diskontinuitäten beim Abbau von Phosphatidylcholin. Diese könnten auf Membranhomogenitäten zurückzuführen sein, welche durch Detergenzeigenschaften des Arachidonoyl-CoA eliminiert werden.

4.3.3 Spezifität der Phospholipase-A₂ gegenüber Phospholipiden in der Thymozytenplasmamembran

Eine Spezifität der Phospholipase-A₂ gegenüber verschiedenen Phospholipiden könnte erklären, daß sich die endogen gebildeten Lysophospholipide nicht über die membrangebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase acylieren lassen. In Bezug auf die zu spaltende Fettsäure wird bei der Phospholipase-A₂ jedoch keine Spezifität gefunden.

Durch topographische Inhomogenitäten kann eine Situation vorliegen, bei der über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase in die Membran eingebaute Fettsäuren für die Phospholipase-A₂ besser angreifbar sind, als Fettsäuren der schon vorher vorhandenen Phospholipide. In diesem Fall würde das Produkt der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase schneller abgebaut werden als das daraus entstehende Lysophospholipid acyliert wird. Ein Austausch von Fettsäuren in den Membranphospholipiden durch einen gekoppelten Deacylierungs-Reacylierungsmechanismus wäre dann erfolglos.

(Über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase in die Thymozytenplasmamembran eingebautes radioaktiv markiertes Phosphatidylcholin wurde mit steigender Phospholipase-A₂-Konzentration 100 Minuten inku-

biert. Danach wurde der Abbau des Phosphatidylcholins über die Verteilung der Radioaktivität auf die Phosphatidylcholin- und Lysophosphatidylcholinfraktion bestimmt. Bei diesem Verfahren wird nur das Phosphatidylcholin erfaßt, welches vorher durch die Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholinacyltransferase gebildet wurde. Der Abbau des gesamten Phosphatidylcholins wurde durch eine Lipidanalyse nach Gerlach-Deuticke bestimmt. Dem ohne Phospholipase- A_2 -Inkubation in der Thymozytenplasmamembran gemessenen Phosphatidylcholinanteil wurde in der Grafik der Wert 100% zugeschrieben (Abb. 4.3.2).

Das durch Markierung mit Hilfe der Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholinacyltransferase gekennzeichnete Phosphatidylcholin unterlag einem sehr viel höheren Abbau durch die Phospholipase- A_2 , wie aus den Bestimmungen des Gesamtabbaus des Phosphatidylcholins zu erwarten war.

Der Versuch, den Abbau und Einbau von Fettsäuren in Phospholipide durch eine gekoppelte Reaktion der Phospholipase- A_2 und Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholinacyltransferase durchzuführen, mußte aus den oben angegebenen Gründen aufgegeben werden.

4.4 Umacylierung der Membranphospholipide in zwei Reaktionsschritten

Nach den oben beschriebenen Versuchen muß die Phospholipase- A_2 , welche Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin in der Membran bildet, vor der Acylierungsreaktion inaktiviert oder entfernt werden. Da schon kleine Mengen Phospholipase- A_2 einen Einbau von Fettsäuren in Membranlysophospholipide verhindert, wurde versucht, Phospholipase- A_2 durch zweimaliges Waschen der Membranen mit 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, zu entfernen. Bei dieser Reaktionsführung war es unklar, inwieweit

Phosphatidyl-
cholin
%

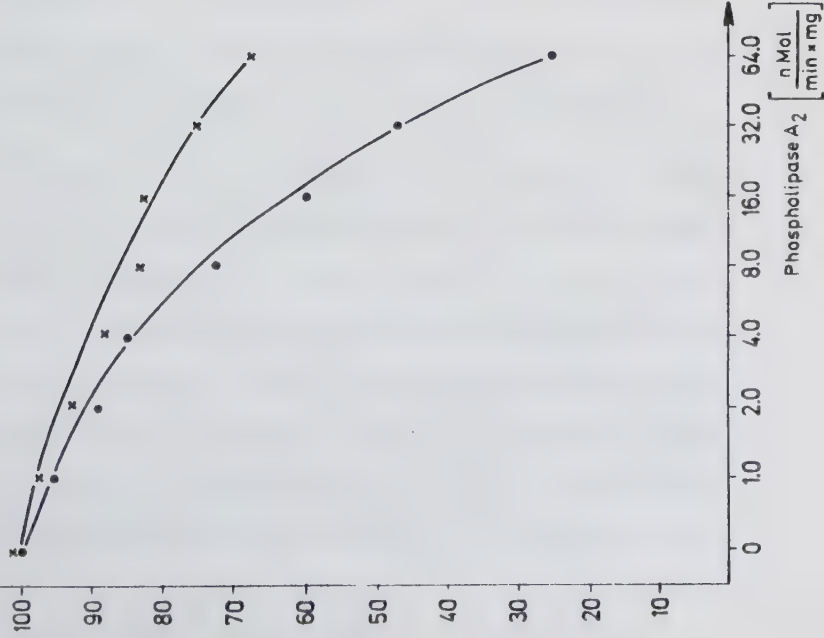


Abb. 4.3.2

x-x-x = Abbau der gesamten Phosphatidylcholinfraktion
 •-•-• = Abbau des über die Acyl-CoA: Lysophosphatidyl-
 cholinacyltransferase acylierten Phosphatidylcholins

Thymozytenplasmamembranen wurden mit Arachidonoyl-CoA (30 nMol/mg Protein) und radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin (30 nMol/mg Protein) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Lysophosphatidylcholin wurde dabei zu 80% in radioaktiv markiertes Phosphatidylcholin übergeführt.

Diese markierten Membranen wurden mit steigenden Konzentrationen an Phospholipase A_2 (0 - 86,4 nMol/min pro mg Protein) mit Ca^{2+} (3 nM) 10 Minuten inkubiert und danach zweimal gewaschen. Nach der Extraktion der Lipide wurde der Abbau von Phosphatidylcholin über die radioaktiv markierten Produkte (x-x-x) und über eine Phospholipidbestimmung nach Gerlach-Deuticke (•-•-•) untersucht. 100% Phosphatidylcholin entspricht den Membranen bei Inkubation ohne Phospholipase A_2 .

Abbau von Phosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen nach Inkubation mit Phospholipase A_2

die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase nach der Inkubation mit Phospholipase-A₂ und dem Waschen der Membranen noch genügend Restaktivität für die Acylierung der Lysophospholipide zeigt.

4.4.1 Reacylierung von Lysophospholipiden mit Arachidonoyl-CoA

a) Reacylierung von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin

Die Phosphatidylcholinfraktion von Thymozytenplasmamembranen läßt sich gut radioaktiv markieren. Dazu werden der Membran äquimolare Mengen an Lysophosphatidylcholin und Arachidonoyl-CoA angeboten (30 nMol/mg Protein). Während der Inkubation bei 37°C läßt sich das Lysophosphatidylcholin enzymatisch zu ca. 80% in Phosphatidylcholin überführen. Das Ziel unserer Versuchsführung bestand darin, derart markierte Thymozytenplasmamembranen nach Inkubation mit Phospholipase-A₂ (analog Kapitel 4.3.1) und zweimaligem Waschen mit 10 mM-HEPES, pH = 7,4, durch Arachidonoyl-CoA enzymatisch zu acylieren. Die Phospholipase-A₂ hydrolysiert Phosphatidylcholin zu Lysophosphatidylcholin. Dabei bildet sich in den vormarkierten Thymozytenplasmamembranen radioaktiv markiertes Lysophosphatidylcholin. Wie aus dem gleichbleibenden Phospholipid/Proteinverhältnis zu erkennen ist, wird dieses durch das Waschen mit dem Puffer kaum aus der Membran entfernt. Der Erfolg der Reacylierung des Lysophosphatidylcholins läßt sich dann aus der prozentualen Zunahme von radioaktiv markiertem Phosphatidylcholin und der prozentualen Abnahme von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin beurteilen.

Thymozytenplasmamembranen wurden radioaktiv markiert und mit einer hohen Phospholipasekonzentration (400 nMol/min Phospholipase-A₂ pro mg Protein) 10 Minuten mit Ca²⁺ (3 mM) inkubiert. Das Ca²⁺ wurde mit einem vierfachen Überschuß von EDTA komplexiert und die Membranen zweimal

mit 10 mM-HEPES, pH = 7,4, gewaschen. Die spezifische Aktivität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase war nach der Inkubation mit Phospholipase-A₂ und dem zweimaligen Waschen der Membranen auf 9,0 mMol/mg min erniedrigt. Weiteres Inkubieren der mit Phospholipase-A₂ behandelten Membranen bei 37°C über 12 Stunden ohne Zusatz von Arachidonoyl-CoA ergab teilweise einen Abbau von Lysophosphatidylcholin in Glycerophosphorylcholin und freie Fettsäuren. Dieser Abbau ist einer in der Thymozytenplasmamembran enthaltenen Lysophospholipase zuzuordnen. Der Zusatz von äquimolaren Mengen Arachidonoyl-CoA über das gebildete Lysophosphatidylcholin ergab nach einer Stunde Inkubation 18,1% und nach 15 Stunden 41,8% radioaktiv markiertes Phosphatidylcholin (Tabelle 4.4.1). Nach Inkubation der Membran mit Phospholipase-A₂ lag der Phosphatidylcholingehalt bei 2,9%.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die zweistufige Umacylierung von Phospholipiden mit Hilfe der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase möglich ist.

b) Untersuchung der Reacylierung durch dünnsschichtchromatographische Trennung der Lipide. - (Lipidanalyse nach Gerlach-Deuticke)

In dieser Versuchsreihe sollte die Acylierung von endogen über die Phospholipase-A₂ gebildeten Lysophospholipiden durch eine direkte Analyse der Lipide bestimmt werden.

Thymozytenplasmamembranen (660 µg) wurden mit steigenden Phospholipase-A₂-Konzentrationen und Ca²⁺ (3 mM) während 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal mit 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, gewaschen. Vorversuche haben gezeigt, daß ein Zusatz von EDTA zum Waschpuffer schlechtere Reacylierungsergebnisse gibt.

Reacylierung von endogen gebildetem Lysophosphatidylcholin

	Phosphatidylcholin	Lysophosphatidylcholin	Fett-säuren
Radioaktiv markierte Membranen	72,3%	18,8%	3,9%
Phospholipase-A ₂ behandelte Membranen	2,8%	91,8%	4,7%
Gewaschene Membranen	2,9%	90,6%	5,3%
Inkubation mit Arachidonoyl-CoA 40 Minuten	18,1%	73,4%	6,9%
Inkubation mit Arachidonoyl-CoA 15 Stunden	41,8%	39,8%	15,5%
Inkubation ohne Arachidonoyl-CoA 12 Stunden	2,3%	76,4%	20,0%

Tab. 4.4.1 Die prozentualen Angaben entsprechen der Verteilung der Radioaktivität auf die Lipidfraktionen.

Eine Hälfte der Phospholipase- A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen wurde sukzessive mit 200 nMol Arachidonoyl-CoA versetzt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei wurde Lysophosphatidylcholin in Phosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin in Phosphatidyläthanolamin überführt. Die Membranlipide wurden anschließend extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Phospholipidfraktionen erfolgte nach Gerlach-Deuticke (s. Methodik). Bei Inkubation mit Arachidonoyl-CoA ergab sich ein wesentlich höherer Anteil an Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin als bei Inkubation ohne Arachidonoyl-CoA (Abb. 4.4.1). Das Gesamtphospholipid/Proteinverhältnis änderte sich durch den Abbau und die Reacylierung der Phospholipide kaum. Der prozentuale Anteil von Phosphatidyläthanolamin lag bei Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit Arachidonoyl-CoA, welche vorher nicht mit Phospholipase- A_2 behandelt wurden, wesentlich höher als bei unbehandelten Membranen. Dies zeigt, daß die von uns verwendeten Thymozytenplasmamembranen Lysophosphatidyläthanolamin enthalten.

c) Charakterisierung der Fettsäurezusammensetzung der Phosphatidylcholinfraktion nach Reacylierung mit Arachidonoyl-CoA

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Phosphatidylcholinfraktion der Thymozytenplasmamembran nach Abbau mit Phospholipase- A_2 und Reacylierung mit Arachidonoyl-CoA wurde mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt. Dabei ergab sich nach 15 Stunden Inkubation mit Arachidonoyl-CoA ein Arachidonsäuregehalt in der Phosphatidylcholinfraktion von 20% (Tabelle 4.4.2). Dies entspricht einer zehnfachen Steigerung gegenüber unbehandelten Membranen. Die Fettsäurezusammensetzung des restlichen Phosphatidylcholin nach Inkubation mit Phospholipase- A_2 unterschied sich

Reacylierung der Phospholipide in Thymozytenplasmamembranen nach Hydrolyse mit Phospholipase A₂

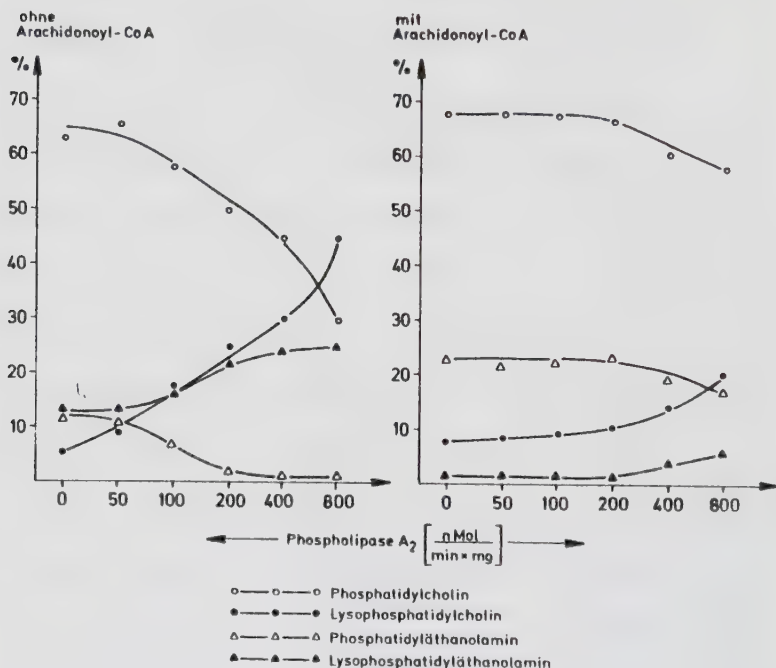


Abb. 4.4.1

Thymozytenplasmamembranen wurden mit steigenden Konzentrationen an Phospholipase A₂ (0 - 800 nMol/min pro mg Protein) und Ca²⁺ (3 mM) 10 Minuten inkubiert und zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen. Diese Membranen wurden mit Arachidonoyl-CoA (500 nMol/mg Protein) bzw. ohne Arachidonoyl-CoA 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Arachidonoyl-CoA wurde der Membransuspension sukzessive während 2 Stunden zugesetzt.

Änderung der Fettsäurezusammensetzung in der Phosphatidylcholinfraktion nach Reacylierung mit Arachidonoyl-CoA

Fettsäuren	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4
Native Membranen	38,6%	3,2%	15,4%	27,7%	31,1%	2,1%
Phospholipase-A ₂ behandelte Membranen	40,2%	1,0%	28,2%	23,9%	6,1%	0,6%
Reacylierte Membranen	32,1%	1,0%	20,7%	21,3%	5,0%	20,0%

Tab. 4.4.2 Thymozytenplasmamembranen (600 µg) wurden mit 400 nMol/mg min Phospholipase-A₂ und Ca²⁺ (3 mM) 10 Minuten inkubiert und danach zweimal gewaschen. Eine Hälfte wurde mit 200 nMol Arachidonoyl-CoA 15 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Zum Vergleich wurden native Thymozytenplasmamembranen analysiert.

im Sättigungsgrad vom ursprünglich in der Membran enthaltenen Phosphatidylcholin. Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren zeigten eine höhere Abbaurrate als Phospholipide mit gesättigten Fettsäuren. Dies zeigt, daß die Phospholipase-A₂ Phosphatidylcholin mit ungesättigten Fettsäuren in 2-Stellung bevorzugt abbaut (s. Kapitel 4.3.3). Dies gilt besonders für Phosphatidylcholin mit Arachidonsäure in der 2-Stellung. Da die Phospholipase-A₂ keine Spezifität gegenüber Fettsäuren zeigt, deutet dies auch auf eine Inhomogenität der Thymozytenplasmamembran hin. Lipide mit ungesättigten Fettsäuren in 2-Stellung scheinen besonders leicht angreifbar für die Phospholipase-A₂ zu sein. Da die ungesättigten Fettsäuren in die Phospholipide über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase eingebaut werden, zeigt sich hier eine gute Regulationsmöglichkeit für die Fettsäurestruktur von Phospholipide. Nachträglich eingebaute Fettsäuren lassen sich auch leicht wieder entfernen.

4.4.2 Einfluß der Reacylierung der Lysophospholipide mit Arachidonoyl-CoA auf die spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase

Die Mg²⁺-ATPase zeigt bei der Spaltung von Phospholipiden in ihre Lysoverbindungen einen starken Anstieg in ihrer spezifischen Aktivität (s. Kapitel 4.2.1). Diese Aktivität sollte sich durch Reacylieren der Lysophospholipide in der oben beschriebenen Weise verändern lassen.

Thymozytenplasmamembranen wurden mit steigenden Konzentrationen von Phospholipase-A₂ und Ca²⁺ (3 mM) 10 Minuten inkubiert und zweimal mit 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, gewaschen. Eine Hälfte wurde mit Arachidonoyl-CoA reacyliert, während die andere Hälfte zur Kontrolle mitinkubiert wurde. Die spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase von reacylierten Thymozytenplasmamembranen war stark erniedrigt. Werden die

Membranen mit hohen Phospholipase- A_2 -Konzentrationen (1200 nMol/mg min) inkubiert, so führt die Reacylierung zu einer Inaktivierung unter den Ausgangswert der nativen Membranen. Die läßt sich nicht mehr einer Umkehrung der Aktivierung der Mg^{2+} -ATP'ase durch Abbau von Phospholipiden zuschreiben (Tabelle 4.4.3).

Wurden Thymozytenplasmamembranen ohne vorherige Hydrolyse der Phospholipide mit Arachidonoyl-CoA inkubiert, so erhöhte sich entgegen jeder Vermutung die Aktivität der Gesamt-ATP'ase auf 167% der Ausgangsaktivität. Die Erhöhung der Gesamt-ATP'ase ließ sich durch Ouabain wieder vollständig hemmen. Dies zeigt, daß diese Erhöhung der Aktivierung einer Na^+ , K^+ -ATP'ase zuzuschreiben ist. Darauf soll in Kapitel 4.5 näher eingegangen werden.

Bei allen Proben, die vor der Acylierungsreaktion mit Phospholipase- A_2 inkubiert wurden, entsprach die spezifische Aktivität der Gesamt-ATP'ase der Mg^{2+} -ATP'ase.

Die spezifische Aktivität der γ -Glutamyltransferase lag bei allen Proben unverändert bei $24,4 \pm 1,2$ nMol/mg · min und zeigte so keine Abhängigkeit von der Phospholipidzusammensetzung der Thymozytenplasmamembranen.

Bei diesem Stand der Untersuchungen war es fraglich, inwieweit die Inaktivierung der Mg^{2+} -ATP'ase bei hohem Phospholipase- A_2 -Abbau und Reacylierung mit Acyl-CoA auf den Einbau von Fettsäuren oder auf einen unspezifischen Detergenzeffekt des Arachidonoyl-CoA zurückzuführen ist.

Thymozytenplasmamembranen (500 μ g) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Arachidonoyl-CoA reacyliert, nachdem sie vorher mit Phospholipase- A_2 inkubiert worden waren. Bei einem Teil der Proben wurde die Acylierungsreaktion nach 10 Minuten, in einem anderen Teil der Proben nach 4 Stunden durch Einfrieren gestoppt. Die Mg^{2+} -ATP'ase-Bestimmung zeigte

Einfluß der Reacylierung auf die Mg^{2+} -ATPase

Phospholipase- A_2 (nMol/mg · min)	00	300	1200	
Inkubation ohne Arachidonoyl-CoA	42,4	61,4	80,8	spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase (nMol/mg · min)
Inkubation mit Arachidonoyl-CoA	40,2*	59,0	38,8	

Tab. 4.4.3 * = Aktivität der Gesamt-ATPase = 70,6 nMol/mg · min

Thymozytenplasmamembranen (500 µg) wurden mit Phospholipase- A_2 inkubiert,
gewaschen und mit Arachidonoyl-CoA (500 nMol) reacyliert.

auch bei kurzer Inkubationszeit, bei der keine Arachidonsäure eingebaut wird, eine Hemmung, die ungefähr 60% der Hemmung der Enzymaktivität nach 4 Stunden entspricht (Abb. 4.4.2a). Der unspezifische Inhibitionseffekt des Arachidonoyl-CoA auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase sollte in weiteren Versuchen durch Waschen der Membranen mit einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung eliminiert werden. Dadurch sollte restliche Arachidonsäure bzw. restliches Arachidonoyl-CoA, welches nicht in die Membran eingebaut wurde, entfernt werden.

Bei diesen Versuchen war der unspezifische Inhibitionseffekt des Arachidonoyl-CoA bis zu einer Zugabe von 300 nMol/mg Protein nicht mehr zu beobachten. Bei 4 Stunden Inkubation mit Arachidonoyl-CoA war die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase auf die Hälfte abgesunken. Dies zeigt, daß der unspezifische Effekt des Arachidonoyl-CoA auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase durch Waschen mit Rinderserumalbumin von dem Effekt der Arachidonsäure beim Einbau in die Membran separiert werden kann.

Durch gemeinsame Inkubation des Arachidonoyl-CoA mit 0,25-1% Rinderserumalbumin bei dem Reacylierungsschritt wurde versucht, den unspezifischen Effekt des Acyl-CoA auf die Mg^{2+} -ATPase zu eliminieren. Das Arachidonoyl-CoA bindet gut an Rinderserumalbumin und sollte von dort direkt als Substrat für die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase wirken können. Unter diesen Bedingungen wurde aber kein Einbau von Arachidonsäure in die Thymozytenplasmamembranen beobachtet.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche beschreiben eine Möglichkeit, Fettsäuren von Phospholipiden der Thymozytenplasmamembran durch eine enzymatische Deacylierungs-Reacylierungs-Technik auszutauschen. Der dabei auftretende unspezifische Effekt des Acyl-CoA auf die Mg^{2+} -ATPase nach hydrolytischem Abbau der Phospholipide mit Phospholipase- A_2 läßt sich durch Waschen mit Rinderserumalbumin (1%) eliminieren.

Unspezifische Hemmung der Mg^{2+} -ATPase nach Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit Phospholipase A_2 und Arachidonoyl-CoA

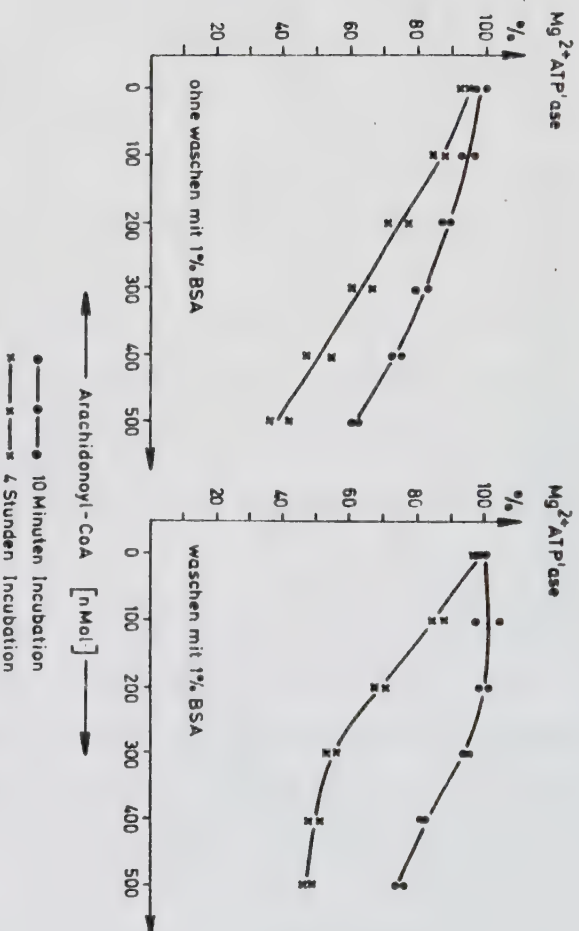


Abb. 4.4.2a

Thymozytenplasmamembranen (500 µg Protein) wurden mit Phospholipase A_2 (800 nMol/min pro mg Protein) und Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten inkubiert und danach zweimal gewaschen. Die dadurch erhöhte Mg^{2+} -ATPase-Aktivität ist mit 100% angegeben. Diese Membranen wurden mit steigenden Konzentrationen an Arachidonoyl-CoA (0 - 500 nMol/500 µg Protein) 10 Minuten bzw. 4 Stunden inkubiert. Eine Hälfte der Membran wurde mit 1% Rinderserumalbumin (BSA), die andere Hälfte ohne Rinderserumalbumin gewaschen.

Abb. 4.4.2b

4.4.3 Einbau verschiedener Fettsäuren in Phospholipase-A₂ behandelte Thymozytenplasmamembranen

Neben der Arachidonsäure sollten auch andere Fettsäuren wie Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure in vorher mit Phospholipase-A₂ behandelte Membranen eingebaut werden. Dies sollte eine Aussage zulassen, ob die Abnahme der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase direkt von der eingebauten Fettsäure und deren Struktur, oder nur allgemein durch Einbau von Fettsäuren reguliert wird.

Die Versuche wurden analog den Versuchen in Kapitel 4.4.1 durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Phospholipase-A₂-Konzentrationen (300 und 1200 nMol/mg · min) gewählt. Die niedrigere Konzentration sollte bei Zugabe von Acyl-CoA (300 und 600 nMol/mg Protein) einen kleineren unspezifischen Hemmeffekt auf die Mg^{2+} -ATPase zeigen. Die mit der hohen Phospholipase-A₂-Konzentration behandelten Thymozytenplasmamembranen wurden entsprechend den Versuchen in Kapitel 4.4.2 mit 700 und 1000 nMol/mg Acyl-CoA inkubiert. Hier muß ein deutlicher unspezifischer Inhibitionseffekt des Acyl-CoA auf die Mg^{2+} -ATPase erwartet werden.

Die unterschiedliche Spezifität der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase gegenüber den verschiedenen Acyl-CoA ließ keine einheitlichen Reacylierungsergebnisse erwarten. Dies bestätigte sich während den Experimenten (s. Tabelle 4.4.4). Dabei wurde bei Stearoyl-CoA als Substrat praktisch kaum ein Einbau gemessen und wurde deshalb aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen. Zum Vergleich der verschiedenen Einbauraten von Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure wurden die prozentualen Lysophosphatidylcholin-, Lysophosphatidyläthanolamin-, Phosphatidylcholin- und Phosphatidyläthanolaminverhältnisse als Kriterium verwendet (s. Kapitel 4.4.1b).

Zum Vergleich der Reacylierung bei den Versuchen mit verschiedenen Acyl-CoA wurde der Acylierungsgrad der Phosphatidylcholin- und Phosphatidyläthanolaminfraktion einzeln bestimmt. Um den Mengenverhältnissen in der Thymozytenmembran gerecht zu werden, wurde der Acylierungsgrad des Phosphatidylcholins mit 2/3, der Acylierungsgrad des Phosphatidyläthanolamins mit 1/3 gewichtet. Die Summe der gewichteten Acylierungsgrade ergab den Acylierungsgrad der Thymozytenmembran nach Abbau mit Phospholipase-A₂ bzw. Reacylierung mit Acyl-CoA. Dieser Acylierungsgrad lag bei nativen Thymozytenmembranen (je nach verwendeter Charge) zwischen 77% und 90%.

Die mit Phospholipase-A₂ behandelten und reacylierten Thymozytenplasmamembranen zeigen eine lineare Korrelation zwischen der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase und dem Acylierungsgrad (Abb. 4.4.3). Änderte sich der Acylierungsgrad der Membranphospholipide bei Inkubation mit 0 bzw. 300 nMol/mg · min Phospholipase-A₂ und Reacylierung mit 0,300 bzw. 600 nMol/mg Acyl-CoA nach oben oder unten, so änderte sich die Aktivität der Mg^{2+} -ATPase linear in entgegengesetzter Richtung. Diese strenge Korrelation zwischen Acylierungsgrad und der Aktivität der Mg^{2+} -ATPase läßt einen unspezifischen Effekt der Acyl-CoA unwahrscheinlich erscheinen.

Bei Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit höheren Phospholipase-A₂-Konzentrationen (1200 nMol/mg · min) und anschließender Inkubation mit 700 bzw. 1000 nMol/mg Acyl-CoA ergab sich eine lineare Korrelation zwischen Acylierungsgrad und der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase parallel auf erniedrigter Stufe (Abb. 4.4.3). Die erhöhte Hemmung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase läßt sich durch unspezifische Effekte der Acyl-CoA auf die Membran erklären (s. Kapitel 4.4.2).

Prozentualer Anteil der Lipidfraktionen nach Inkubation mit Phospholipase-A₂ und Reacylierung mit Acyl-CoA

Acyl-CoA	Arachidonyl-CoA				Oleoyl-CoA				Palmitoyl-CoA			
Phospholipid-fraktion	Lyso-PC %	PC %	Lyso-PE %	PE %	Lyso-PC %	PC %	Lyso-PE %	PE %	Lyso-PC %	PC %	Lyso-PE %	PE %
P.Lip.A ₂ (nMol/ mg min	Acyl-CoA (nMol/mg)											
0	10,2	54,8	10,0	25,0	8,9	55,1	14,2	23,7	3,4	67,5	2,6	26,6
0	7,0	57,8	9,1	26,0	10,4	52,3	13,8	23,4	1,2	68,6	0,0	30,0
0	6,8	58,1	0,0	35,0	7,4	55,5	0,0	37,1	1,3	69,8	3,2	25,7
300	40,0	23,0	23,6	13,6	43,0	17,3	23,3	16,4	31,5	38,5	16,1	13,9
300	36,6	24,0	25,6	13,7	35,6	24,2	18,6	21,7	27,1	42,8	15,5	14,5
300	36,4	26,2	20,2	17,1	31,2	29,0	18,9	21,0	20,7	49,3	5,7	24,3
1200	52,7	9,1	33,0	5,1	52,1	7,6	32,5	7,8	34,9	35,0	22,2	7,8
1200	26,9	35,9	2,1	35,1	39,9	15,4	26,5	14,3	31,7	38,4	14,5	10,5
1200	28,9	35,6	16,1	19,1	32,5	26,7	16,5	24,5	25,8	44,4	11,6	18,4

Tab. 4.4.4

Lyso-PC = Lysophosphatidylcholin

PC = Phosphatidylcholin

Lyso-PE = Lysophosphatidyläthanolamin

PE = Phosphatidyläthanolamin

P.Lip.A₂= Phospholipase-A₂

Zusammengefaßter Acylierungsgrad von Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin

Fettsäure		Arachidonsäure	Ölsäure	Palmitinsäure
Phospholipase-A ₂ (nMol/mg min)	Acyl-CoA (nMol/mg)	Acylierungsgrad %	Acylierungsgrad %	Acylierungsgrad %
0	0	80,0	77,9	93,8
0	300	84,1	76,6	98,9
0	600	93,0	92,2	95,1
300	0	36,5	32,9	52,1
300	300	38,0	44,9	57,0
300	600	43,4	49,7	74,0
1200	0	10,3	14,9	42,0
1200	700	69,6	30,2	48,2
1200	1000	55,0	50,0	62,6

Tab. 4.4.5

Die hier dargestellten Acylierungsgrade wurden aus den Werten der Tabelle 4.4.4 berechnet. Die prozentualen Acylierungsgrade von Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin wurden getrennt bestimmt und gewichtet (nach Mengenteil in der Membran) durch den zusammengefaßten Acylierungsgrad dargestellt.

Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} vom Acylierungsgrad der membrangebundenen Phospholipide

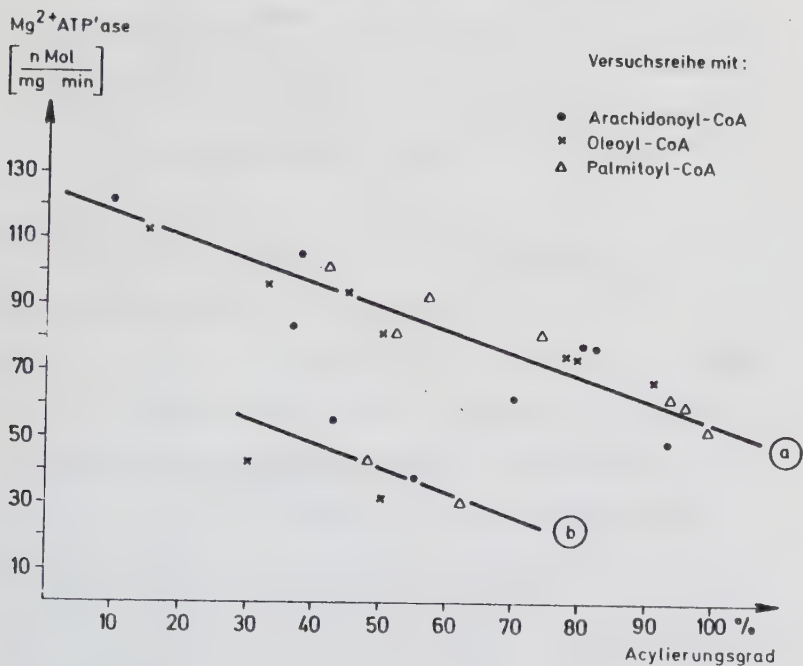


Abb. 4.4.3

Inkubation mit	Phospholipase A_2 nMol/mg min	Acyl-CoA nMol/mg
a	0	0
	0	300
	0	600
	300	0
	300	300
	300	600
	1200	0
	1200	700
b	1200	1000

Wie in Kapitel 4.2.2 (Abb. 4.2.3) dargestellt wurde, zeigt die Fluidität der Thymozytenplasmamembranen eine strenge Korrelation mit dem Acylierungsgrad der Membranphospholipide. Die gleiche Korrelation gilt auch zwischen dem Acylierungsgrad und der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase. Daraus ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase von der Fluidität der Membran.

Da die für die Reacylierung verwendeten Fettsäuren keinen spezifischen Einfluß auf die Mg^{2+} -ATPase zeigten, muß der oft diskutierte Einfluß der Fettsäurestruktur auf die Membranfluidität in diesem Fall ausgeschlossen werden.

4.4.4 Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase durch Erhöhung des Cholesteringehalts des Thymozytenplasmamembranen

Wie in Abb. 4.2.3 gezeigt wurde, besteht nicht nur ein linearer Zusammenhang zwischen dem Acylierungsgrad der Membranphospholipide und der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase, sondern auch zwischen Acylierungsgrad und Mikroviskosität der Thymozytenplasmamembranen. Die Mikroviskosität von Plasmamembranen läßt sich linear mit dem Phospholipid/Cholesterinverhältnis in Zusammenhang setzen (Cooper et al., 1978). Dem entspricht auch die beobachtete Erhöhung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase bei erniedrigtem Phospholipid/Cholesteringehalt (Abb. 4.2.7). Durch direkte Zugabe von Cholesterin zu Thymozytenplasmamembranen sollte qualitativ geklärt werden, inwieweit dadurch die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase erhöht werden kann.

Thymozytenplasmamembranen (250 µg) wurden mit 0-100 nMol Cholesterin in 1 ml eines 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, 2 Stunden unter Rühren bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle wurde nach der Inkubation neben der Mg^{2+} -ATPase auch die spezifische Aktivität der γ -Glutamyltransferase bestimmt.

Für die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATP'ase konnte eine Erhöhung auf 138%, bezogen auf den Kontrollansatz, gemessen werden. Die γ -Glutamyltransferase zeigte bei diesen Versuchen keine Aktivitätsveränderungen. Eine stärkere Erhöhung der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATP'ase ist wegen des schlechten Einbaus von Cholesterin aus der wässrigen Lösung kaum zu erwarten.

4.5 Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATP'ase in Kalbthymozytenplasmamembranen durch Einbau von Arachidonsäure

Im Laufe der oben beschriebenen Versuche wurde bei der Zugabe von Arachidonoyl-CoA zu nativen Thymozytenplasmamembranen eine starke Aktivierung der Gesamt-ATP'ase beobachtet (bis ca. 180%, s. Tabelle 4.4.3). Diese Aktivierung entsprach nicht dem in Kapitel 4.4 beschriebenen Prinzip der Steigerung der spezifischen Aktivität einer ATP'ase durch Verminderung des Acylierungsgrades. Während den bisherigen ATP'ase-Bestimmungen wurden neben der Gesamt-ATP'ase (s. Methodik) auch immer deren ouabainhemmbare Anteil mitbestimmt. Dieser entsprach bei allen Versuchen maximal 7% der Gesamtaktivität. Das bedeutet, daß bei diesen Versuchen die Gesamt-ATP'ase der Mg^{2+} -ATP'ase gleichgesetzt werden kann. Der ouabainhemmbare Anteil entspricht der Na^+ , K^+ -ATP'ase. Diese zeigte in den bisher beschriebenen Versuchen nur eine geringe spezifische Aktivität.

Die spezifische Aktivität der Gesamt-ATP'ase zeigte nach Zugabe von Arachidonoyl-CoA zu nativen Membranen eine starke Erhöhung. Diese ließ sich durch Ouabain wieder vollständig hemmen.

Die im vorigen Kapitel beschriebene Mg^{2+} -ATP'ase läßt sich durch den Abbau von Fettsäuren aus den Phospholipiden aktivieren. Im Gegensatz

dazu wird die ouabainsensitive Na^+ , K^+ -ATPase durch Einbau von Arachidonsäure in die Thymozytenplasmamembran aktiviert.

4.5.1 Versuchsvorführung zur Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase

Die Vorbehandlung der Membranen (zweimaliges Waschen mit 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, 3 mM Ca^{2+}) wurde gegenüber den Versuchen mit Phospholipase- A_2 aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit nicht geändert.

Thymozytenplasmamembranen (12 mg) wurden mit Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten inkubiert und danach zweimal mit 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, gewaschen. Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde in 12 ml 10 mM-HEPES-Puffer, pH = 7,4, resuspendiert und in 12 gleiche Portionen aufgeteilt. Zu den gewaschenen Membranen wurde sukzessive in steigenden Konzentrationen (0-400 nMol/mg) Arachidonoyl-CoA als auch zur Kontrolle Oleoyl-CoA gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation wurden die Membranen zweimal gewaschen und die verschiedenen Sedimente in je 3 ml HEPES/Saccharose aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die spezifische Aktivität der Gesamt-ATPase wurde sowohl mit als auch ohne Ouabain bestimmt. Der ouabainhemmbare Anteil der Gesamt-ATPase wurde als Na^+ , K^+ -ATPase gekennzeichnet.

Die oben beschriebenen Versuche wurden sowohl für Arachidonoyl-CoA als auch für Oleoyl-CoA 4-fach durchgeführt. Bei allen Versuchen zeigte sich eine hohe Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase bei Behandlung mit einer optimalen Konzentration von Arachidonoyl-CoA. Bei Versuchen mit Oleoyl-CoA als Substrat wurden nur kleine Aktivierungen beobachtet (s. Abb. 4.5.1). Bei höheren Arachidonoyl-CoA-Konzentrationen sank die prozentuale Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase auf den Ausgangswert zurück. Dies

Aktivierung der Na^+, K^+ -ATPase in Thymozytenplasmamembranen

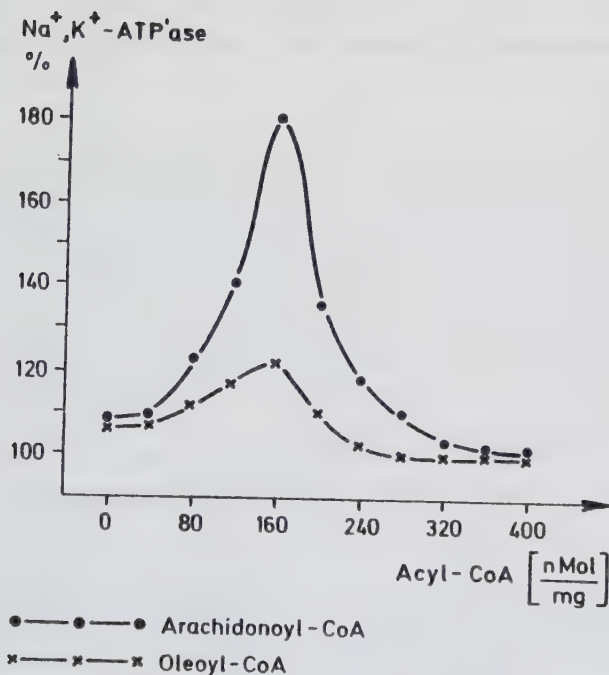


Abb. 4.5.1

Thymozytenplasmamembranen wurden in HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) mit Ca^{2+} (3mM) 10 Minuten inkubiert und danach zweimal gewaschen. Die Membranen wurden dann mit steigenden Konzentrationen (0 - 400 nMol/mg Protein) Arachidonoyl-CoA bzw. Oleoyl-CoA 4 Stunden inkubiert und zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen.

100% = mit Ouabain.

zeigt eine große Empfindlichkeit der Na^+ , K^+ -ATPase für hohe Konzentrationen an Acyl-CoA. Die absolute Aktivitätssteigerung der Na^+ , K^+ -ATPase betrug ungefähr das 10-fache, bezogen auf die Anfangsaktivität (4,0 nM/mg · min auf 39,0 nM/mg · min).

Zur Kontrolle wurde die spezifische Aktivität der γ -Glutamyltransferase in den verschiedenen Proben bestimmt. Diese zeigten keine Veränderungen bei der Zugabe von Acyl-CoA auf die Thymozytenplasmamembranen.

4.5.2 Einbau von Fettsäuren in native Thymozytenplasmamembranen

Das Ziel dieser Versuche war es, den Stoffwechsel von Acyl-CoA in der Thymozytenplasmamembran zu verfolgen. Wir beschränkten uns auf Oleoyl-CoA als Substrat, da es im Gegensatz zu Arachidonoyl-CoA in radioaktiv markierter Form vorlag. Oleoyl-CoA wird auch von der Acyl-CoA: Lyso-phosphatidylcholinacyltransferase als Substrat akzeptiert und zeigt so viel Ähnlichkeit mit Arachidonoyl-CoA.

Durch Inkubation von vorher mit Ca^{2+} (3 mM) inkubierten und zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschenen Thymozytenplasmamembranen (s. Kapitel 4.5.1) mit radioaktiv markiertem Oleoyl-CoA sollte untersucht werden, wie dieses von den verschiedenen Enzymen der Thymozytenplasmamembranen metabolisiert wird.

Die Lipide der Proben wurden nach dreistündiger Inkubation mit Oleoyl-CoA extrahiert (s. Methodik) und über die radioaktive Verteilung die Anteile an Ölsäure in den verschiedenen Lipidfraktionen bestimmt.

Die Ausbeute an wiedergefundener Ölsäure entsprach bis zu einer Inkubationskonzentration von 240 nMol/mg Oleoyl-CoA 100%. Bei höheren Oleoyl-CoA-Konzentrationen wurden praktisch keine größeren Mengen an Ölsäure wiedergefunden. Die nicht wiedergefundene Ölsäure liegt noch als

Oleoyl-CoA vor und geht beim Ausschütteln mit Methanol/Chloroform/H₂O in die wässrige Phase über. Tabelle 4.5.1 zeigt die mengenmäßige Verteilung der Ölsäure auf die verschiedenen Lipidfraktionen nach der Dünnschichtchromatographie.

Bei Zugabe von 160 nMol/mg Oleoyl-CoA waren 36% der Ölsäure in die Phosphatidylcholin- und Phosphatidyläthanolaminfraktion der Thymozytenplasmamembran inkorporiert. Bei einem durchschnittlichen Phosphatidylcholingehalt der Plasmamembran von 380 nMol/mg und einem Phosphatidyläthanolamingehalt von ungefähr 140 nMol/mg sind durch die Oleoyl-CoA-Inkubation 6% des Phosphatidylcholins und 25% des Phosphatidyläthanolamins mit Ölsäure markiert. Bei einer Inkubationskonzentration von 320 nMol/mg Oleoyl-CoA und 400 nMol/mg Oleoyl-CoA blieb die gebildete Menge an freier Fettsäure konstant. Bei dieser Konzentration hatte die Acyl-CoA-Hydrolase ihre Substratsättigung erreicht. Weiteres Oleoyl-CoA wurde nicht mehr metabolisiert.

Erst bei diesen Konzentrationen erniedrigte sich sowohl die Aktivität der Na⁺, K⁺-ATPase wie auch der Fettsäureeinbau.

4.5.3 Vergleich der Mikroviskosität von Thymozytenplasmamembranen nach Acylierung mit Arachidonoyl-CoA und Oleoyl-CoA

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob die Aktivierung der Na⁺, K⁺-ATPase möglicherweise auf eine Änderung der Fluidität der Thymozytenplasmamembran nach Acylierung mit Arachidonoyl-CoA zurückzuführen ist. Nach der in Kapitel 5.4.2 beschriebenen Methode wurden Thymozytenplasmamembranen mit verschiedenen Arachidonoyl-CoA- und Oleoyl-CoA-Konzentrationen acyliert. Von allen Proben wurde die Mikroviskosität (s. Methodik) über fluoreszenzpolarisationsspektroskopische Messungen mit

Metabolismus von Oleoyl-CoA bei Inkubation mit Thymozytenplasmamembranen

Substrat	Lipidfraktion (nach Inkubation)			
	Phosphatidylcholin (nMol/mg)	Phosphatidyläthanolamin (nMol/mg)	Fettsäure (nMol/mg)	Oleoyl-CoA (nMol/mg)
Oleoyl-CoA (nMol/mg)				
80	20	18	36	0
160	23	36	83	0
240	24	34	158	0
320	18	24	177	64
400	16	23	174	156

Tab. 4.5.1

DPH im Bereich zwischen 10°C und 40°C bestimmt (s. Abb. 4.5.2). Für die Arachidonoyl-CoA und Oleoyl-CoA behandelten Thymozytenplasmamembranen ergab sich bei der Fluiditätsmessung die gleiche konzentrationsabhängige Abnahme der Mikroviskosität. Bei beiden Substraten sank die Mikroviskosität der Thymozytenplasmamembran um ca. 30%, bezogen auf die Ausgangsviskosität.

Die Flußaktivierungsenergien (s. Methodik) blieben bei Einbau von Ölsäure und Arachidonsäure in die Thymozytenplasmamembran konstant. Erst bei hohen Substratkonzentrationen (400 nMol/mg) änderten sich die Flußenergien bei 25°C bzw. 23°C. Dies deutet auf einen Phasenübergang hin. Hier macht sich möglicherweise der membransolubilisierende Effekt der Acyl-CoA bemerkbar.

4.5.4 Untersuchung zur Reversibilität der Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivierung

In Kapitel 4.5.1 konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase ein spezifischer Effekt von Arachidonoyl-CoA ist. Die gleiche Versuchsführung mit Oleoyl-CoA ergab nur eine geringfügige Erhöhung der Enzymaktivität. Durch die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche sollte geklärt werden, in welcher Form die Arachidonsäure für die Enzymaktivierung verantwortlich ist. In erster Linie könnte es sich hierbei um kovalent durch Acylieren in Phospholipid gebundene Arachidonsäure, um freie Arachidonsäure oder um Arachidonoyl-CoA handeln.

Dornand (1974) beschreibt eine ähnliche Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase nach Inkubation von Lymphozytenplasmamembranen aus Schweinelymphknoten mit Desoxycholat. Derartige Versuche mit Thymozytenplasmamembranen ergaben bei uns nur negative Ergebnisse.

Durch Abbau der Phospholipide mit geringen Konzentrationen an Phospholipase- A_2 sollte untersucht werden, inwieweit nur eingebaute Arachidon-

Bestimmung der Mikroviskosität von Thymozytenplasmamembranen nach
Einbau von Arachidonsäure bzw. Ölsäure in Membranphospholipide

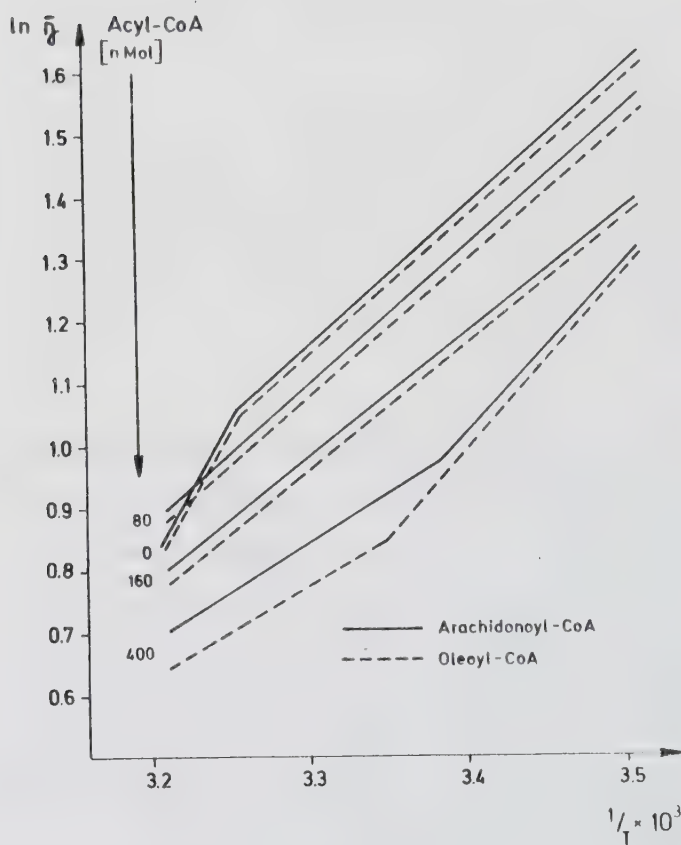


Abb. 4.5.2

Gewaschene Thymozytenplasmamembranen wurden mit Acyl-CoA (0 - 400 nMol/mg Protein) 4 Stunden inkubiert und danach zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen. Die Mikroviskosität der Membran wurde über die Fluoreszenzpolarisation mit DPH bestimmt.

säure eine Na^+ , K^+ -ATPase aktiviert. Beim Abbau sollte diese wieder gehemmt werden, da gezeigt werden konnte, daß über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase in Phospholipide eingebaute Arachidonsäure bevorzugt hydrolysiert wird (Kap. 4.3.3). Das Waschen mit verschiedenen Konzentrationen von Rinderserumalbumin sollte Fettsäuren und restliches Acyl-CoA entfernen.

Thymozytenplasmamembranen (15 mg) wurden mit Ca^{2+} (3 mM) und 18 ml HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) 10 Minuten inkubiert und anschließend bei 50 000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in 24 ml HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) aufgenommen. Diese gewaschenen Membranen wurden mit steigenden Mengen (0-600 nMol/mg) Arachidonoyl-CoA während 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen und in HEPES/Saccharose bei -20°C eingefroren. Von diesen Proben wurde durch Messung der spezifischen Aktivität der ATPase mit und ohne Ouabain die Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase bestimmt. Proben mit einem Anteil von mehr als 25% Na^+ , K^+ -ATPase in Bezug auf die Gesamt-ATPase wurden gepoolt und für die weiteren Untersuchungen in gleiche Teile aufgeteilt.

3 Proben wurden mit steigenden Konzentrationen an Phospholipase- A_2 , 3 Proben mit steigenden Mengen an Rinderserumalbumin versetzt und 20 Minuten inkubiert. Alle Membranen wurden mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) zweimal gewaschen, zentrifugiert und in HEPES/Saccharose aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt. Von den verschiedenen behandelten Membranen wurde die Gesamt-ATPase mit und ohne Ouabain bestimmt. Die Na^+ , K^+ -ATPase nahm mit steigender Phospholipase- A_2 -Behandlung ab, während Waschen mit Rinderserumalbumin keinen Effekt auf die Na^+ , K^+ -ATPase zeigte (Abb. 4.5.3). Bei allen Bestimmungen blieb die spezifische Aktivität der γ -Glutamyltransferase konstant.

Reversibilität der Aktivierung der Na^+, K^+ -ATPase

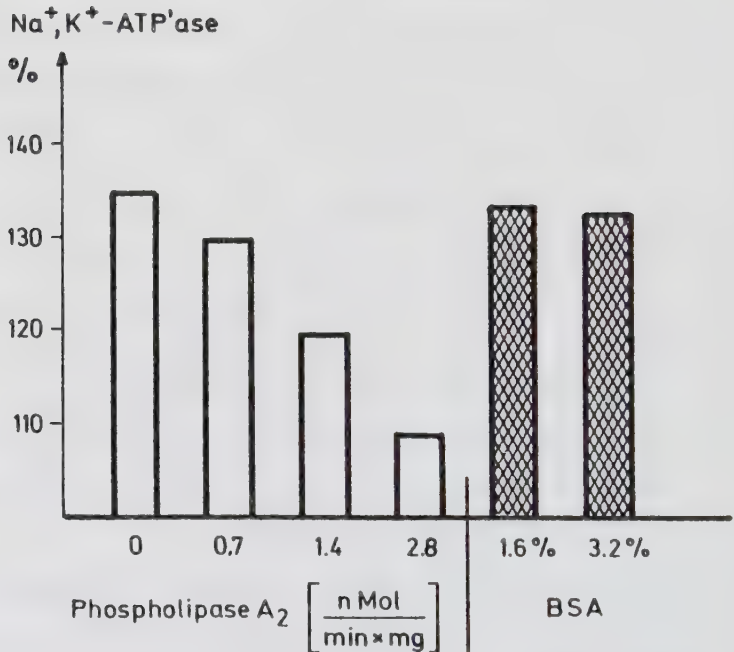


Abb. 4.5.3

Nach Aktivierung der Na^+, K^+ -ATPase durch Einbau von Arachidonsäure in Thymozytenplasmamembranen wurden die Membranen mit Phospholipase A_2 (0 - 2,8 nMol/min pro mg Protein) bzw. Rinderserumalbumin (BSA; 1,6% und 3,2%) 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen. 100% = mit Ouabain.

Eine gaschromatische Bestimmung der freien Fettsäuren in den mit Rinder-serumalbumin gewaschenen Fraktionen zeigte keine freie Arachidonsäure (0,2%). Ein unspezifischer Effekt von Arachidonsäure oder von Arachidonyl-CoA konnte somit ausgeschlossen werden. Die Abnahme der Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität bei Inkubation mit Phospholipase- A_2 zeigte, daß die Struktur der Phospholipide eine wichtige Bedingung für die Aktivität dieses Enzyms ist. Da gezeigt werden konnte, daß über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase eingebaute Arachidonsäure bevorzugt von Phospholipase- A_2 abgebaut wird (Abb. 4.3.2), zeigt die Abnahme der Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität nach Inkubation mit Phospholipase- A_2 , daß in die Membranphospholipide eingebaute Arachidonsäure für den Aktivierungseffekt der Na^+ , K^+ -ATPase verantwortlich ist.

Die spezifische Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase und Mg^{2+} -ATPase zeigt in Bezug auf ihre Regulation ein völlig unterschiedliches Verhalten. Während die Mg^{2+} -ATPase durch Änderung der Mikroviskosität der Thymozytenplasmamembran reguliert wird, scheint die in den Phospholipiden enthaltene Arachidonsäure für die Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase entscheidend zu sein.

4.6 Hydrolyse von Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen

Die in der Thymozytenplasmamembran enthaltene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase überträgt aktivierte Fettsäuren auf Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin. Eine Umacylierung von Fettsäuren in Phospholipiden ist aber nur dort möglich, wo vor der Reacylierungsreaktion Phospholipide durch eine Phospholipase- A_2 hydrolysiert wurden. Bisher ließ sich aber eine Phospholipase- A_2 in Thymozytenplasmamembranen nicht nachweisen (Ferber et al., 1980).

Geht man von der Voraussetzung aus, daß in Thymozytenplasmamembranen immer eine konstante Konzentration an Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin für Acylierungsreaktionen zur Verfügung steht, so stellt sich die Frage, wie durch Neubildung wieder genügend Substrat für die Acylierungsreaktion zur Verfügung gestellt werden kann. Eine direkte Bildung von Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin aus den acylierten Komponenten durch membrangebundene Enzyme muß dabei ausgeschlossen werden.

4.6.1 Metabolismus von Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen

Während dieser Versuchsreihe sollte der Abbau von Lysophosphatidylcholin durch die Lysophospholipase in Thymozytenplasmamembranen untersucht werden. Dabei wurden gleichzeitig zwei Untersuchungstechniken angewandt. Einmal wurde radioaktiv markiertes Lysophosphatidylcholin eingesetzt und die nach Inkubation mit Thymozytenplasmamembranen gebildeten Produkte analysiert. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Produkte von unmarkiertem Lysophosphatidylcholin nach der Inkubation mit Thymozytenplasmamembranen durch dünnschichtchromatographische Trennung der Phospholipide und Phosphatbestimmung nach Gerlach-Deuticke untersucht.

Thymozytenplasmamembranen (12 mg) wurden mit Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten inkubiert, mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen und bei 50 000 UpM zentrifugiert. Das Sediment der Zentrifugation wurde in HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) resuspendiert. Diesen vorbehandelten Thymozytenplasmamembranen wurde radioaktiv markiertes Lysophosphatidylcholin (1,2 μM ; 1 μC) zugesetzt. In einem Teil der Proben wurden die Lipide sofort, in einem anderen Teil erst nach 3 Stunden Inkubation extrahiert.

Über die radioaktive Verteilung der verschiedenen Lipidfraktionen in der Dünnschichtchromatographie wurde der Abbau des radioaktiv markierten Lysophosphatidylcholins bestimmt (Tabelle 4.6.1).

Abbau von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin nach Inkubation mit Thymozytenplasmamembranen

Verteilung der Radioaktivität auf:	Inkubationsdauer	
	0 Std.	3 Std.
Lysophosphatidylcholin	98,30%	4,60%
Sphingomyelin	0,12%	0,45%
Phosphatidylcholin	0,62%	4,50%
Phosphatidyläthanolamin	0,06%	2,00%
Freie Fettsäuren	0,41%	86,60%
Neutrallipide	0,42%	1,92%

Tab.4.6.1

Dabei wurde fast alles exogen zugegebene Lysophosphatidylcholin in Glycerophosphorylcholin und freie Fettsäure hydrolysiert.

Ein völlig anderes Ergebnis zeigte die Bestimmung der Phospholipide nach Gerlach-Deuticke. Schon beim Anfärben der Dünnschichtplatten mit Jod (s. Methodik), zeigte die Farbintensität der Lysophosphatidylcholinfraktion qualitativ eine stark erhöhte Lysophosphatidylcholinmenge gegenüber unbehandelten Membranen. Die quantitative Analyse ergab einen Anteil von 22,2% Lysophosphatidylcholin an den gesamten Phospholipiden. Dies entspricht 165 nMol/mg Lysophosphatidylcholin. Unbehandelte Thymozytenplasmamembranen zeigten einen Anteil von 8,5% Lysophosphatidylcholin, d.h. 60 nMol/mg Lysophosphatidylcholin. Durch Vergleich der Analysenergebnisse läßt sich ausschließen, daß das exogen zugegebene Lysophos-

phatidylcholin vollständig hydrolysiert wird, während in der Membran schon vorher vorhandenes Lysophosphatidylcholin sich einem Abbau durch die Lysophospholipase vollständig entzieht. Würde sich nur das schon vor der Inkubation in der Thymozytenplasmamembran vorhandene Lysophosphatidylcholin einem Abbau durch die Lysophospholipase entziehen, dann dürfte die Lysophosphatidylcholinmenge nicht 9% des Gesamt-phospholipids übersteigen. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch einen Anteil von 22% des Lysophosphatidylcholins am Gesamtphospholipidgehalt der Membran nach exogener Zugabe von Lysophosphatidylcholin. Dies widerspricht den Ergebnissen der Versuche mit radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin. Bei diesen Versuchen waren 95,4% des exogen zugegebenen Lysophosphatidylcholins metabolisiert.

4.6.2 Spezifität der Lysophospholipase gegenüber verschieden radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin

Unwahrscheinlich, jedoch nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, daß das radioaktiv markierte Lysophosphatidylcholin sich von dem nicht markierten Lysophosphatidylcholin unterscheidet, und so eine verschiedene Spezifität gegenüber der Lysophospholipase zeigt.

Selbstpräpariertes Cholin- C^{14} markiertes Lysophosphatidylcholin wurde mit dem von uns bisher verwendeten Acyl(C_1)- C^{14} markierten Lysophosphatidylcholin in der Hydrolysegeschwindigkeit nach Inkubation mit Thymozytenplasmamembranen verglichen.

Lysophosphatidylcholin (600 nMol) wurde sowohl mit Lysophosphatidylcholin-(Cholin-Methyl- C^{14}) wie auch mit Lysophosphatidylcholin-(Acyl- C_1 - C^{14}) radioaktiv markiert. Dieses auf verschiedene Art radioaktiv markierte Lysophosphatidylcholin wurde jeweils mit 1 mg Thymozytenplasmamembran während 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die Lipide der Proben

extrahiert. Die Radioaktivität in der Chloroformphase wurde Lysophosphatidylcholin, die Radioaktivität in der wässrigen Phase Glycerophosphorylcholin zugeordnet. Zur Kontrolle wurde eine Probe parallel ohne Thymozytenplasmamembranen mitinkubiert und extrahiert. Hier fanden sich 97,8% der Radioaktivität in der organischen Phase. Die Proben, in denen die Fettsäuren markiert waren, wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht. In den mit Thymozytenplasmamembran inkubierten Proben wurde nach 3 Stunden ein Abbau des Lysophosphatidylcholins von 32% (Cholin- C^{14} markiertes Lysophosphatidylcholin) bzw. 29% (Fettsäure- C^{14} markiertes Lysophosphatidylcholin) gemessen. Dies zeigte, daß die Hydrolysegeschwindigkeit für den enzymatischen Abbau für Lysophosphatidylcholin in Glycerophosphorylcholin und Fettsäuren unabhängig von der Herkunft des Lysophosphatidylcholins ist.

4.6.3 Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen von der Substratkonzentration

Während dieser Versuchsreihe wurde der hydrolytische Abbau von Lysophosphatidylcholin bei steigender Substratkonzentration untersucht. Dabei wurde nicht markiertes mit radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin gemischt. Beide Lysophosphatidylcholinanteile enthielten Palmitinsäure als Acylrest.

Thymozytenplasmamembranen (0,1 mg) wurden mit steigenden Konzentrationen von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin (0-60 nM) versetzt und bei 37°C im Wasserbad 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben ausgeschüttelt (Hanahan, s. Methodik) und die Radioaktivität sowohl in der organischen wie auch in der wässrigen Phase bestimmt. Zur

Kontrolle wurden 17,3 nMol von radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin ohne Thymozytenplasmamembranen unter gleichen Bedingungen mitinkubiert. Aus der Verteilung der Radioaktivität auf die Lysophosphatidylcholin- und Fettsäurefraktion konnte der prozentuale Anteil an nicht hydrolysiertem Lysophosphatidylcholin bestimmt werden. Die Gesamtausbeute wurde als Summe der Fettsäure- und Phosphatidylcholinfraktion angegeben. Für einen zweiten Teil der Proben wurden die Phospholipide dünnschichtchromatographisch getrennt und nach Gerlach-Deuticke auf ihren Lysophosphatidylcholingehalt untersucht. Das in der nativen Thymozytenplasmamembran enthaltene Lysophosphatidylcholin betrug 8,6 nMol/100 µg und wurde von dem gemessenen Lysophosphatidylcholingehalt subtrahiert. Das so betrachtete Lysophosphatidylcholin entspricht dem exogen zugegebenen, jedoch unhydrolysierten Lipid. Dieser Anteil wurde mit den über die radioaktive Verteilung gemessenen Ergebnissen verglichen (Tabelle 4.6.2).

Die graphische Darstellung (Abb. 4.6.1) zeigt, daß bei höheren Lysophosphatidylcholinkonzentrationen kein Unterschied bei der Betrachtung des Abbaus nach der radioaktiven Verteilung und der Analytik nach Gerlach-Deuticke besteht. Bei kleinen Konzentrationen an Lysophosphatidylcholin zeigt die Bestimmung nach Gerlach-Deuticke einen hohen Restwert an Substrat. Dieser übersteigt den Wert des zuvor eingesetzten Lysophosphatidylcholins (Abb. 4.6.1).

Für zellfreie Überstände von Rattenleber (Erbland, Marinetti, 1965), Hefe, Erythrozyten und Leukozyten wurde eine Transacylierung beobachtet, bei der 2 Lysophosphatidylcholinmoleküle, 1 Phosphatidylcholin- und 1 Glycerophosphorylcholinmolekül bilden:



Konzentrationsabhängigkeit des hydrolytischen Abbaus von Lysophosphatidylcholin
bei Inkubation mit Thymozytenplasmamembranen

Eingesetztes Lyso- phosphatidylcholin (radioaktiv markiert) (nMol)	Prozentuale Ausbeute (Radioaktivität)	Anteil der Fettsäuren %	Lysophosphatidyl- cholin (rad.Best.) (nMol)	Lysophosphatidylcholin (Gerlach-Deuticke) (nMol)	-8,6nMol*
3,6	96%	52%	1,9	15,8	7,2
7,2	114%	51%	3,7	17,7	9,1
14,4	98%	49%	7,1	19,7	11,1
28,8	129%	48%	13,8	29,7	21,1
43,3	114%	35%	15,2	36,4	27,8
57,7	120%	26%	15,0	49,7	41,1
Kontrolle:					
17,3	100%	0%		17,3	

*= in nativen Thymozytenplasmamembranen
(100 µg) enthaltenes Lysophosphatidylcholin

Hydrolyse von Lysophosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen

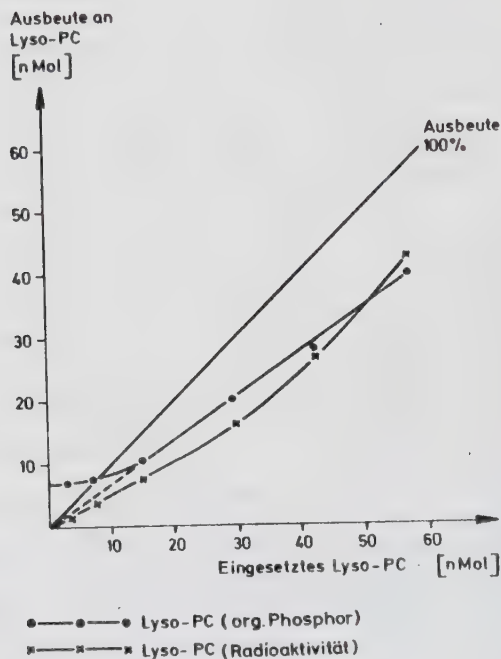
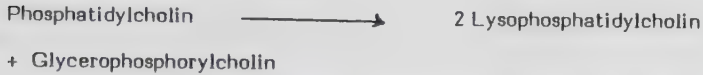


Abb. 4.6.1

Thymozytenplasmamembranen (100 µg) wurden mit steigenden Konzentrationen an radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin (0 - 60 nMol) 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das danach in den Membranen enthaltene Lysophosphatidylcholin wurde über die radioaktive Verteilung und über eine Gesamtphospholipidbestimmung nach Gerlach-Deuticke bestimmt.

- Bei
- a) hoher Phosphatidylcholkonzentration
 - b) kleiner Lysophosphatidylcholkonzentration
 - c) Anwesenheit von Glycerophosphorylcholin
 - d) hydrolytischer Spaltung von Lysophosphatidylcholin ($-\Delta G^\circ$)

müßte die Umkehrung der oben beschriebenen Reaktion energetisch günstiger verlaufen



Durch einen solchen Mechanismus wäre es möglich, Lysophosphatidylcholin aus Phosphatidylcholin zu bilden, ohne daß über eine Phospholipase-A₂ unnötig hohe, lytische Konzentrationen produziert werden. Dies könnte auch die ungewöhnlich konstante Gleichgewichtskonzentration von Lysophosphatidylcholin in nativen Thymozytenplasmamembranen trotz Anwesenheit einer Lysophospholipase erklären.

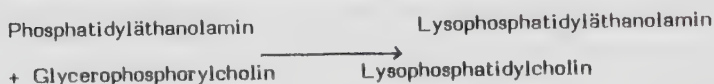
4.6.4 Abbau von membrangebundenem Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin durch Zugabe von Glycerophosphorylcholin

Sollte es möglich sein, Phosphatidylcholin mit Hilfe von Glycerophosphorylcholin durch eine Transacylierungsreaktion in Lysophosphatidylcholin überzuführen, so sollte eine signifikante Abnahme von Phosphatidylcholin in Thymozytenplasmamembranen nach Zugabe von Glycerophosphorylcholin nachweisbar sein.

Thymozytenplasmamembranen (6 mg) wurden mit Ca^{2+} (3 mM) in 6 ml HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) 10 Minuten inkubiert und einmal mit dem Puffer gewaschen. Die in Puffer resuspendierten Thymozytenplasmamembranen wurden in 12 gleiche Teile geteilt und mit steigenden Mengen (0-640 nMol/mg) Glycerophosphorylcholin 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach

wurden die Lipide extrahiert und quantitativ bestimmt. Zum Vergleich der verschiedenen Anteile der Phospholipide wurden jeweils die Verhältnisse zu Sphingomyelin berechnet und in der Grafik aufgetragen (s. Abb. 4.6.2 und 4.6.3). Dabei nahm der Phosphatidylcholingehalt um 8% und der Lysophosphatidyläthanolgehalt um 13% ab. Dies entspricht 32 nMol/mg Phosphatidylcholin und 23 nMol/mg Phosphatidyläthanolamin.

Nach diesen Versuchsergebnissen muß das Modell in Kapitel 4.6.3 um eine Reaktion, die Phosphatidyläthanolamin abbaut, erweitert werden:



In weiteren Versuchen sollte dieser Mechanismus bestätigt werden. Thymozytenplasmamembranen wurden dazu mit Lysophosphatidylcholin (0-400 nMol/mg) und Arachidonoyl-CoA (300 nMol/mg) versetzt. Dieses Lysophosphatidylcholin sollte durch die in der Thymozytenplasmamembran vorhandenen Lysophospholipase teilweise hydrolysiert werden und so Glycerophosphorylcholin bilden. Dieses könnte dann über den oben vorgeschlagenen Mechanismus bei Lysophosphatidylcholinmangel weiteres Lysophosphatidylcholin durch Übertragung einer Acylgruppe von Phosphatidylcholin auf Glycerophosphorylcholin nachbilden. Das Arachidonoyl-CoA kann über die membrangebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase Lysophosphatidylcholin acylieren und so einen Mangel an Lysophosphatidylcholin hervorrufen.

Thymozytenplasmamembranen (24 mg) wurden mit Ca^{2+} (3 mM) in 24 ml HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) 10 Minuten inkubiert und einmal mit Puffer gewaschen. Die in Puffer aufgenommenen Thymozytenplasmamembranen wurden in 12 gleiche Teile geteilt und mit steigenden Mengen Lysophosphatidylcholin (0-400 nMol/mg) bei Anwesenheit von Arachi-

Abbau von Phosphatidylcholin durch Inkubation von Thymozytenplasma-
membranen mit Glycerophosphorylcholin

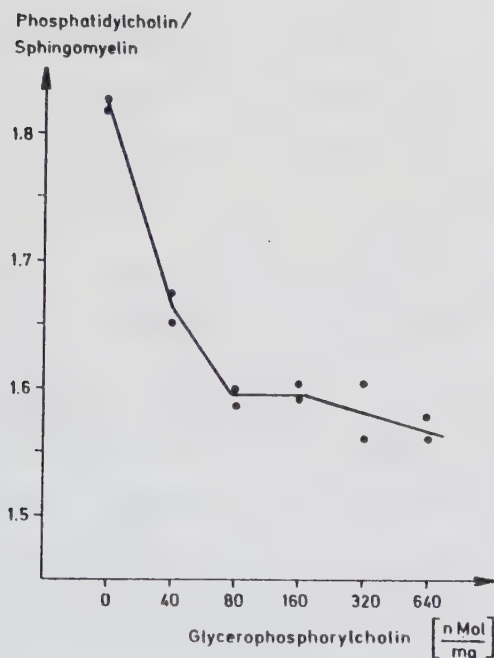


Abb. 4.6.2

Thymozytenplasmamembranen wurden mit Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten inkubiert und mit HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen. Die Membranen wurden mit steigenden Konzentrationen an Glycerophosphorylcholin (0 - 640 nMol/mg Protein) 2 Stunden bei 37°C inkubiert und nach der Extraktion der Membranlipide wurde das Phosphatidylcholin/Sphingomyelinverhältnis nach Gerlach-Deuticke bestimmt.

Abbau von Phosphatidyläthanolamin durch Inkubation von Thymozyten-
plasmamembranen mit Glycerophosphorylcholin

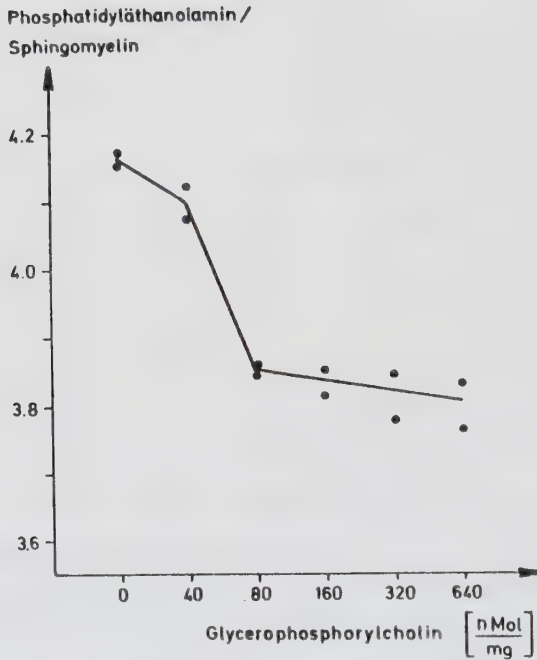


Abb. 4.6.3

Die Thymozytenplasmamembranen wurden wie in Abb. 4.6.2 behandelt. Nach Extraktion der Membranphospholipide wurde das Phosphatidyläthanolamin/Sphingomyelinverhältnis bestimmt.

donoyl-CoA (300 nMol/mg) 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Lipidanalyse wurde wie im vorigen Abschnitt nach Gerlach-Deuticke durchgeführt. Betrachtet wurde wieder das Phosphatidylcholin/Sphingomyelin- und das Phosphatidyläthanolamin/Sphingomyelinverhältnis (Abb. 4.6.4 und 4.6.5).

Das Phosphatidylcholin nahm bei Zugabe von wenig Lysophosphatidylcholin (40 nMol/mg) um 25%, das Lysophosphatidyläthanolamin um 30% ab. Größere Mengen von Lysophosphatidylcholin erhöhten das Phosphatidylcholin- bzw. Phosphatidyläthanolamin/Sphingomyelinverhältnis wieder. Dies ist der Acylierungsreaktion der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholin-acyltransferase zuzuordnen. Trotzdem findet sich kein linearer Anstieg, sondern ein Plateau mit steigender Lysophosphatidylcholkonzentration. Dies widerspricht den Erwartungen aus den Ergebnissen von Kapitel 4.1 und 4.2. Dort konnte gezeigt werden, daß in diesem Konzentrationsbereich 70% des zugegebenen radioaktiven Lysophosphatidylcholins mit Arachidonoyl-CoA acyliert wird. Das in diesem Versuchsteil gefundene Plateau weist aber auf ein dynamisches Gleichgewicht von Acylierung mittels Arachidonoyl-CoA zu Phosphatidylcholin und Deacylierung zu Lysophosphatidylcholin hin. Auch dieser Deacylierungsmechanismus könnte mit dem Modell der Transacylierung einer Fettsäure von Phosphatidylcholin bzw. Phosphatidyläthanolamin auf Glycerophosphorylcholin erklärt werden.

Abhängigkeit des Phosphatidylcholingehaltes der Thymozytenplasma-
membran von exogenen Substraten

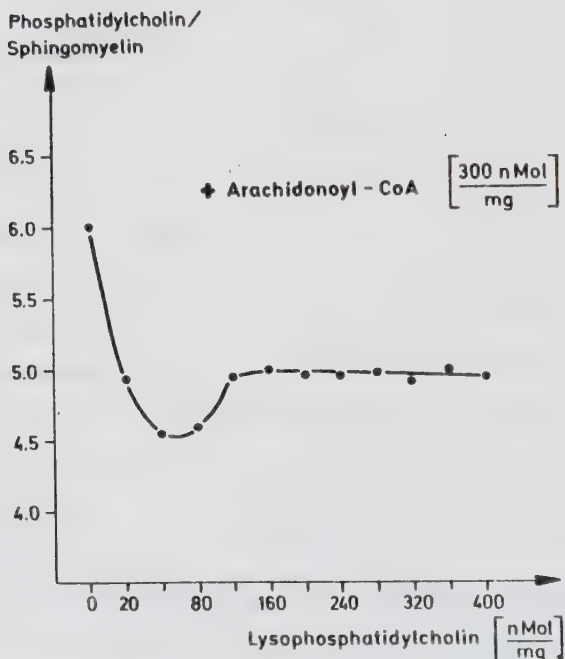


Abb. 4.6.4

Thymozytenplasmamembranen wurden mit Ca^{2+} (3 mM) 10 Minuten in HEPES-Puffer (10 mM, pH = 7,4) inkubiert und mit Puffer gewaschen. Die Membranen wurden mit steigenden Lysophosphatidylcholkonzentrationen (0 - 400 nMol/mg Protein) und Arachidonoyl-CoA (300 nMol/mg Protein) 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Phosphatidylcholin/Sphingomyelinverhältnis wurde nach Gerlach-Deuticke bestimmt.

Abhängigkeit des Phosphatidyläthanolamingehaltes der Thymozyten-
plasmamembran von exogenen Substraten

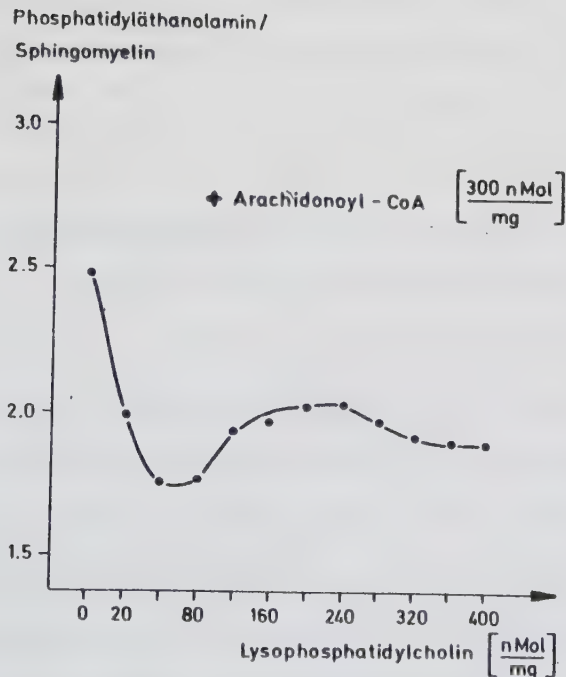


Abb. 4.6.5

Thymozytenplasmamembranen wurden wie in Abb. 4.6.4 behandelt. Das Phosphatidyläthanolamin/Sphingomyelinverhältnis wurde nach Gerlach-Deuticke bestimmt.

5. DISKUSSION

5.1 Einfluss der Phospholipide auf Enzymaktivitäten in Thymozytenplasmamembranen

Die Vielfalt der in biologischen Membranen gefundenen Lipide stellt mit ihrer Beziehung zur Membranfunktion noch viele ungelöste Fragen. Nach heutiger Anschauung bilden die Lipide die Basis des Membranaufbaus. Nach dem Fluid-Mosaic-Modell (Singer und Nicolson, 1972) ordnen sich die Lipide in der Membran zu einer flüssigkristallinen Doppelschicht an, in die die membrangebundenen Enzyme integriert sind. Für eine Anzahl dieser Enzyme konnte gezeigt werden, dass Lipide eine notwendige Voraussetzung für ihre Aktivität sind (Übersichtsartikel: Coleman, 1973; Sandermann, 1978).

Die Lipidabhängigkeit membrangebundener Enzyme wurde über die Wirkung von Detergentien, Lösungsmitteln und Phospholipasen auf die Enzymaktivität untersucht (Triggle, 1970; Rothfield und Romeo, 1971; Razin, 1972; Fourcans und Jain, 1974). Dabei muß bei einem Verlust von Enzymaktivität der Begriff der Lipidabhängigkeit vorsichtig diskutiert werden. Auch unspezifische Denaturierung, Hemmung durch Produkte der Membranbehandlung, direkte Einflüsse der Reagenzien bzw. deren Verunreinigungen (z.B. Proteasen) können Enzymaktivitäten hemmen. Fleischer et al. (1962) stellte in diesem Zusammenhang einige Faktoren zusammen, die die Lipidabhängigkeit eines Enzymsystems belegen:

1. Hemmung der Enzymaktivität bei Lipidabnahme

2. Rekonstitution der Enzymaktivität bei Zuführung von exogenem Lipid

Durch solch eine doppelseitige Korrelation sollten Nebeneffekte eliminiert werden, die eine Lipidabhängigkeit als Erklärung für Enzymaktivitätsverluste anbieten. Dabei kann jedoch eine Wirkung der Lipide auf der

Substratseite (Löslichkeit polarer Substrate) nicht ausgeschlossen werden. Das Lipid sollte in solchen Experimenten so schonend wie möglich entfernt werden. Unter den Lösungsmitteln erwies sich in diesem Sinn Aceton als erfolgreich (Fleischer und Fleischer, 1967). Allgemein hat sich die Inkubation mit Phospholipasen als besonders schonend erwiesen. In einigen Fällen konnte jedoch gezeigt werden, daß Produkte der Phospholipase-Behandlung hemmend auf Enzymaktivitäten wirken. Diese mußten vor der Reaktivierung mit Albumin entfernt werden (Fleischer et al., 1966; Duttera et al., 1969). In anderen Fällen stabilisierten Lysophospholipide und Fettsäuren die Aktivität der membrangebundenen Enzyme. Erst nachdem die phospholipasebehandelten Membranen mit Albumin gewaschen waren, zeigte sich eine Hemmung der Enzymaktivität (Fiehn und Hasselbach, 1970).

Für die Rekonstitution der Aktivität lipidabhängiger Enzyme ist auch die Form, in der die Lipide dem Enzym zugeführt werden, von Bedeutung. Bei den meisten in der Literatur beschriebenen Rekonstitutionsversuchen werden die Lipide in feindisperser Form zugesetzt und mehrere Stunden mit der Membran inkubiert (Coleman und Hubscher, 1963; Yamashita und Racker, 1969; Kagawa und Racker, 1971).

Es konnte gezeigt werden, daß Lipide wie Phosphatidylglycerin (Kundig und Roseman, 1971), Cardiolipin (Tobari, 1964), und Phosphatidylcholin (Jurtshuk et al., 1963) spezifisch Enzymaktivitäten beeinflussen können. In anderen Fällen wurde ein mehr unspezifisches Verhalten gegenüber Lipiden gefunden. Studien, die die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den Fettsäuren der Lipide aufzeigten, ergaben, daß Faktoren, die eine höhere Fluidität in der Membran bewirken (Doppelbindungen, kürzere Fettsäuren, Cyclopropanringe), effektiver Membranenzyme rekonstituieren, als Lipide mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren (Jones und Wakel, 1967;

Sartorelli et al., 1969). Ein solcher Einfluß der Fettsäureacylgruppen auf membrangebundene Enzymaktivitäten sollte in der vorgelegten Arbeit für Thymozytenplasmamembranen untersucht werden.

Vorversuche ergaben, daß die membrangebundene Mg^{2+} -ATPase auf Änderungen in der Lipidstruktur reagiert. Die parallel untersuchte γ -Glutamyltransferase und alkalische Phosphatase zeigten unter gleichen Bedingungen keine Lipidabhängigkeit. In diesem Zusammenhang sollte besonders der Einfluß der Arachidonsäure (C 20:4) untersucht werden, die bei Stimulation von Lymphozyten vermehrt über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase in die Plasmamembran eingebaut wird (Ferber und Resch, 1976). Wir hofften, dabei einen Zusammenhang zwischen Lipid-Proteinwechselwirkungen und Zellstimulation zu finden. Im Rahmen der Zellstimulation haben die membrangebundenen ATPasen eine besondere Bedeutung, da sie mit Transportvorgängen der Membran in Verbindung gebracht werden. Bei der Stimulation von Lymphozyten mit Mitogenen wird ein erhöhter energieabhängiger Ca^{2+} - und K^+/Na^+ -Iontentransport beobachtet. Dabei wird die Mg^{2+} -ATPase und Na^+ , K^+ -ATPase aktiviert (Averdunk und Lauf, 1975).

5.1.1 Einfluß von exogen zugegebenem Lipid auf die Mg^{2+} -ATPase

Im Gegensatz zu dem bisher diskutierten Verfahren, Membranlipide in ihrer Fettsäurezusammensetzung zu verändern, versuchten wir durch Acylieren von exogen zugegebenem Lysophosphatidylcholin Arachidonsäure in die Membranphospholipide einzubauen. Es konnte gezeigt werden, daß exogen zugegebenes Lysophosphatidylcholin an die Thymozytenplasmamembran bindet.

Hohe Konzentrationen an Lysophosphatidylcholin ergaben bei diesen Versuchen sowohl eine beträchtliche Solubilisierung wie Inaktivierung der Mg^{2+} -

ATP'ase. Bei Inkubation mit kleineren Lysophosphatidylcholkonzentrationen ließ sich der größte Teil der Membranfunktion mit der Ultrazentrifuge wieder sedimentieren. Die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATP'ase war durch diese Behandlung gehemmt. Exogen zugegebenes Lysophosphatidylcholin ließ sich mit Arachidonoyl-CoA in der Thymozytenplasmamembran bei guter Ausbeute zu Phosphatidylcholin acylieren. Dadurch ließ sich die Mg^{2+} -ATP'ase noch weiter hemmen. Möglicherweise ist in erster Linie nicht die Struktur der Lipide, sondern allgemein das Lipid-Proteinmengenverhältnis für diese Enzymaktivität von Bedeutung. Membrangebundene Enzyme könnten z.B. durch die Lipide von ihrem Substrat getrennt werden. Durch ein erhöhtes Lipidverhältnis würde dann die Diffusion des Substrats und des Cofaktors erniedrigt und die Enzymaktivität gehemmt.

5.1.2 Spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATP'ase nach Inkubation mit Phospholipase- A_2 und Rinderserumalbumin

Nachdem durch die Zugabe von exogenem Lipid die Mg^{2+} -ATP'ase-Aktivität gehemmt werden konnte, wurde der hydrolytische Abbau von endogenem Lipid untersucht. Wir hofften, daß dadurch auch die direkt am Enzym gebundenen Lipide beeinflußt werden. Für den hydrolytischen Abbau der Phospholipide wurde die Membran mit Phospholipase- A_2 inkubiert. Die Phospholipase- A_2 zeigt bei der hydrolytischen Spaltung von Phospholipiden die gleiche Stellungsspezifität wie die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase. Die beiden Enzyme katalysieren genau entgegengesetzt verlaufende Reaktionen. Die Phospholipase- A_2 ist für den Deacylierungsschritt, die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase für den Acylierungsschritt verantwortlich.

Durch steigende Enzymzugabe oder verlängerte Inkubationszeiten konnte der Abbau der Phospholipide mit der Phospholipase-A₂ gut reguliert werden. Nach der Hydrolyse von Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin stieg die spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase bis auf das Doppelte an. Den gleichen stimulierenden Effekt von Phospholipase-A₂ auf die spezifische Aktivität der Mg²⁺-ATPase fanden Hasselbach et al. in Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel. Dabei wurde angenommen, daß die in der Membran noch vorhandenen Hydrolyse-Produkte der Phospholipase-A₂-Reaktion die Aktivität des Enzyms erhalten (Fiehn und Hasselbach, 1970). Warren et al. (1974) fanden nach Reinigung der ATPase aus Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums mit Hilfe von Cholat eine 3-4fache Erhöhung der spezifischen Aktivität im Vergleich zum membrangebundenen Enzym. Auch die Behandlung dieser Membranen mit dem Ionophor X 537A, der die Membran für Ca²⁺ durchlässig macht, erhöhte die spezifische Aktivität des Enzyms auf das 3fache (Scarpa et al., 1972). Allgemein konnte gezeigt werden, daß Detergentien membrangebundene Enzyme aktivieren können. Changeux (1974) diskutierte solche Effekte als Eliminierung eines Zwangs auf das Enzym, der von den Lipiden ausgeübt wird. Danach kann durch das allgemeine Verständnis von Detergenzwirkungen auf Membranproteinen Licht in die Kontrolle von Membranfunktionen gebracht werden.

Durch Waschen mit Rinderserumalbumin inaktivierte Hasselbach die Mg²⁺-ATPase nach Inkubation der Membran mit Phospholipase-A₂ fast vollständig (Fiehn und Hasselbach, 1970). In unserem System ließ sich die Mg²⁺-ATPase nach Inkubation mit Phospholipase-A₂ und Waschen mit Rinderserumalbumin nicht inaktivieren, sondern erhöhte ihre spezifische Aktivität noch weiter. Sogar bei einem Restgehalt von 20% der Membran an

Phospholipid konnte eine stark erhöhte Mg^{2+} -ATPase gemessen werden. Bei einem Restgehalt von 40% an Phospholipid in Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel konnte keine ATPase-Aktivität mehr nachgewiesen werden (Swoboda et al., 1979). Dieses entgegengesetzte Verhalten der membrangebundenen ATPasen kann möglicherweise auf den unterschiedlichen Gehalt der verschiedenen Membranen an Cholesterin zurückgeführt werden.

Für die von uns untersuchte Mg^{2+} -ATPase in Thymozytenplasmamembranen bildet die Lipidumgebung keine notwendige Bedingung für die Aktivität des Enzyms. Darin unterscheidet sich unser System von der Mg^{2+} -ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dieses von Hasselbach et al. untersuchte Enzym zeigte bei einem Restlipidgehalt von weniger als 40% keine Enzymaktivität mehr. Unsere Versuche zeigten, daß sich der Phospholipidgehalt hemmend auf die Mg^{2+} -ATPase der Thymozytenplasmamembran auswirkt. Diese Hemmung kann durch Hydrolyse der Phospholipide mit Phospholipase- A_2 und anschließendem Waschen der Membranen mit Rinderserumalbumin eliminiert werden.

5.1.3 Rekonstitution der mit Phospholipase- A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen mit Acyl-CoA

Die meisten in der Literatur beschriebenen Rekonstitutionsexperimente nach Behandlung von Membranen mit organischen Lösungsmitteln oder Phospholipasen wurde nach der Cholat-Dialysemethode (Racker, 1972), der Ultraschallmethode (Racker, 1973), der Cholat-Verdünnungsmethode (Racker et al., 1975) oder der Lipid-Titrationstechnik (Warren et al., 1974) durchgeführt. Alle Methoden verwendeten artifizielle Verfahren, um der Membran Lipide zuzuführen.

Wir untersuchten mit unserer Methode eine Möglichkeit, die nach Phospholipase-A₂-Behandlung entstandenen Lysophospholipide mit Hilfe der membran gebundenen Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase zu reacylieren. Die Rekonstitution der Membranlipide durch die enzymatische Reacylierungstechnik lehnt sich eng an den Phospholipidmetabolismus von Membranen in situ an. Mit dieser Methode sollte auch der Einfluß von Reaktionsprodukten der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase auf die Aktivität der Thymozytenplasmamembranenzyme untersucht werden, deren Bedeutung für die Lymphozytenstimulation mit Mitogenen diskutiert wird. Der Versuch, die Phospholipide gleichzeitig über eine zyklische Reaktionstechnik mit Phospholipase-A₂ zu hydrolysieren und mit Acyl-CoA zu reacylieren, schlug trotz intensiver Bemühungen fehl. Es konnte gezeigt werden, daß die durch Acylieren mit Acyl-CoA entstandenen Phospholipide durch die Phospholipase-A₂ schneller als die übrigen Phospholipide wieder hydrolysiert werden. Möglicherweise zeigen die über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase gebildeten Phospholipide eine bessere Zugänglichkeit für die Phospholipase-A₂.

Aus diesem Grund wurde die Hydrolyse und Reacylierung in zwei Schritten hintereinander durchgeführt. Dabei mußte vor der Reacylierung die Phospholipase-A₂ durch zweimaliges Waschen der Membranen entfernt werden. Die Reacylierung wurde 1. mit Hilfe von radioaktiv markiertem Phosphatidylcholin, 2. durch dünnschichtchromatografische Trennung der Phospholipide und der quantitativen Bestimmung der Phospholipid-Verteilung nach Gerlach-Deuticke und 3. durch gaschromatografische Untersuchungen verfolgt. Der Erfolg der Reacylierung war vom Typ bzw. der Konzentration des Acyl-CoA und vom Ausmaß der vorhergegangenen Phospholipidhydrolyse abhängig. Bei allen Versuchen, in denen Lysophospholipide wieder reacyliert wurden, erniedrigte sich die nach Phospholipase-A₂-Behandlung erhöhte Aktivität der Mg^{2+} -ATPase. Wurden die Thymozytenplasmamem-

branen mit hohen Phospholipase-A₂-Konzentrationen inkubiert, so sank die Aktivität der Mg²⁺-ATPase nach Reacylierung unter den Ausgangswert nichtbehandelter Membranen. Durch Kontrollversuche, bei denen auf Grund kurzer Inkubationszeiten mit Acyl-CoA keine Reacylierung eintrat, konnte gezeigt werden, daß die Erniedrigung der Mg²⁺-ATPase teilweise auch auf unspezifische Effekte der Acyl-CoA zurückzuführen ist. Diese unspezifischen Effekte (wahrscheinlich Detergenzeffekte) ließen sich durch Waschen mit Rinderserumalbumin teilweise wieder rückgängig machen. Der Versuch, durch Zugabe von Rinderserumalbumin zum Reacylierungsansatz solche unspezifischen Effekte von Anfang an zu unterbinden, war erfolglos, da unter diesen Bedingungen keine Reacylierung beobachtet werden konnte. Vermutlich wird das Substrat zu stark von Rinderserumalbumin gebunden und steht so der Reacylierungsreaktion nicht mehr zur Verfügung. Die unspezifische Hemmung der Mg²⁺-ATPase während der Reacylierung von Phospholipase-A₂ behandelten Thymozytenplasmamembranen zeigte sich nur bei hoher hydrolytischer Spaltung der Phospholipide (ca. 40% Rest-Acylierungsgrad). Bei einem höheren Rest-Acylierungsgrad der Phospholipide (ca. 60%) ergab sich während der Acylierung der Lysophospholipide mit Acyl-CoA eine direkte Korrelation der spezifischen Aktivität der Mg²⁺-ATPase mit dem Acylierungsgrad der Membranphospholipide (s. Fig. 4.4.3).

5.1.4 Einfluß verschiedener Fettsäuren auf die Mg²⁺-ATPase von Thymozytenplasmamembranen

Eine wichtige Aufgabe von Rekonstitutionsexperimenten besteht darin, den Einfluß von verschiedenen Fettsäuren auf Membranaktivitäten zu untersuchen. Hasselbach et al. rekonstituierten Membranen des sarkoplasmatischen

schen Retikulum aus Kaninchenmuskel nach Abbau mit Phospholipase-A₂ und Waschen mit Rinderserumalbumin durch Zugabe von Lysophosphatidylcholin und freien Fettsäuren. Dadurch ließen sich 50 - 70% der ATPase-Aktivität wieder zurückgewinnen. Dabei waren Culpandonsäure, Arachidonsäure und Ölsäure gleichermaßen erfolgreich bei der Wiederherstellung der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität. Im Gegensatz dazu wurde bei Zugabe von Palmitin- und Stearinsäure mit Lysophosphatidylcholin keine höhere Aktivierung über den Lysophosphatidylcholinanteil beobachtet (Fiehn und Hasselbach, 1970).

Hasselbach diskutiert als besondere Bedingung für die Rekonstitution der Mg^{2+} -ATPase in Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums cis-ungesättigte Fettsäuren. Dies unterstreicht Hasselbach durch Anwendung von Prenylamin als Inhibitor für die Rekonstitution der Mg^{2+} -ATPase mit Fettsäuren. Dabei wird angenommen, daß Prenylamin auf cis-ungesättigte Fettsäuren wirkt (Balzer et al., 1968)

In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, daß außer dem Sättigungsgrad auch die Kettenlänge der zugegebenen Fettsäure für die Rekonstitution der Mg^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums von Bedeutung ist (Swoboda et al., 1979).

Warren et al. (1974) fanden mit Hilfe der Lipid-Titrationstechnik eine Abhängigkeit der ATPase-Aktivität der Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel von der zugegebenen Fettsäure. Hier zeigte die ATPase eine geringere Aktivität bei Rekonstitution mit Stearinsäure und Palmitinsäure als bei Rekonstitution mit Ölsäure.

Neben der Erhöhung der spezifischen Aktivität von Membranenzymen wird in den Arbeiten von Galo und Farias (Galo et al., 1975) die Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide mit der allosterischen Regulation der $(Mg^{2+}-Ca^{2+})$ -ATPase aus Erythrozytenmembranen in Zusammenhang ge-

bracht. Die allosterische Regulation wurde durch die Temperatur, den pH-Wert und den Anteil ungesättigter Fettsäuren bestimmt. Dabei wurde angenommen, daß die Membranfluidität die allosterische Regulation beeinflußt.

In dem von uns etablierten System wurde die Abhängigkeit der Mg^{2+} -ATPase aus Thymozytenplasmamembranen von verschiedenen Fettsäuren über die Rekonstitution der Membranlipide durch Acylieren der Lysophospholipide mit Hilfe der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase und Acyl-CoA untersucht. Eingeschränkt wurde dieses System dadurch, daß nur ein begrenztes Spektrum von Fettsäuren in die Lysophospholipide der Membran eingebaut werden konnte. Bei unseren Versuchen gelang eine vernünftige Ausbeute für den Einbau von Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure in die Membranlipide. Da die mit Phospholipase- A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen auch nach Waschen mit Rinderserumalbumin eine stark erhöhte Mg^{2+} -ATPase-Aktivität zeigten, wurde in unserem System nicht die Erhöhung, sondern die Hemmung der Aktivität in Abhängigkeit vom Einbau verschiedener Fettsäuren untersucht. Die Mg^{2+} -ATPase aus Thymozytenplasmamembranen zeigte im Gegensatz zu den oben erwähnten Arbeiten keine Abhängigkeit von der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide. Die Phospholipase- A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen zeigten unabhängig von der Art der eingebauten Fettsäure nach Acylierung mit Acyl-CoA eine umgekehrt lineare Korrelation der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase mit dem Acylierungsgrad. Nur die Acylierungsverhältnisse der Phospholipide in der Thymozytenplasmamembran waren für die Enzymaktivität von Bedeutung. Die Kettenlänge bzw. der Sättigungsgrad der eingebauten Fettsäure zeigte keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase.

Inwieweit die Fettsäurezusammensetzung einen Einfluß auf die allosterische Regulation von Enzymaktivitäten der Thymozytenplasmamembran

hat, könnte über kinetische Studien mit Hilfe der hier beschriebenen Reacylierungstechnik untersucht werden. Vorversuche haben ergeben, daß die Mg^{2+} -ATPase der Thymozytenplasmamembran sich sowohl durch Na^+ , K^+ -Ionen, wie auch durch Ouabain allosterisch regulieren läßt. Für native Thymozytenplasmamembranen stieg der Hill-Koeffizient von $n = 1$ auf $n = 1,7$ (Na^+ , K^+ -Ionen) bzw. $n = 1,8$ (Ouabain) nach Zugabe der Effektoren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde noch nicht der Einfluß der verschiedenen eingebauten Fettsäuren auf den K_M -Wert der Mg^{2+} -ATPase gegenüber Mg^{2+} oder ATP bestimmt. Dies wäre aber auch von Bedeutung, da gezeigt werden konnte, daß der erhöhte Ca^{2+} -Influx bei Stimulation von Lymphozyten mit ConA sich durch einen erniedrigten K_M -Wert der ATPase erklären läßt (Whitney und Sutherland, 1973). Auch diese Frage könnte durch kinetische Studien an reacylierten Thymozytenplasmamembranen untersucht werden.

5.2 Bedeutung der Fluidität auf die plasmamembrangebundene Mg^{2+} -ATPase aus Kalbsthymozyten

Eine große Bedeutung für die Funktion biologischer Membranen wird der Membranfluidität zugemessen. Wichtige Hinweise für die Bedeutung der Membranfluidität auf die Membranfunktion wurden durch Studien an Lipidmutanten von E.coli gewonnen. In diesem System konnte die Lipidstruktur vorhersagbar variiert werden (Silbert et al., 1974). Auch für den physiologischen Zustand von Zellen wird ein Zusammenhang mit der Plasmamembranfluidität diskutiert. Der Zellzyklus von Neuroblasten ist nach De Laat et al. (1978) mit einer Änderung der Fluidität verbunden. Diese ist am geringsten während der Mitose, nimmt stark in der G1-Phase zu, bleibt auf einem hohen Niveau während der S-Phase und nimmt wieder während der G2-Phase ab.

Auch proliferierende Zellen wie Lymphomzellen oder Lymphoblasten zeigen eine höhere Fluidität als ruhende Lymphozyten (Shinitzky und Inbar, 1974; Inbar und Shinitzky, 1975). Im Gegensatz zu Shinitzky und Inbar führen Johnson und Robinson (1979) die erhöhte Fluidität nicht auf einen erniedrigten Cholesteringehalt, sondern auf einen erhöhten Gehalt an freien Fettsäuren und Lysophosphatidylcholin zurück.

Monti et al. (1979) diskutieren einen Zusammenhang zwischen zunehmendem oncogenem Potential und zunehmender Membranfluidität an Mäuse-embryozellen, die gegenüber chemischen Karzinogenen eine morphologische Transformation zeigen.

5.2.1 Abhängigkeit der Fluidität von Thymozytenplasmamembranen vom Acylierungsgrad der Phospholipide

In unseren Versuchen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluidität der Thymozytenplasmamembran und dem Diacyl-Monoacylphospholipid-Verhältnis (Acylierungsgrad) nach Inkubation der Membranen mit Phospholipase A_2 gezeigt werden. Die Fluidität wurde über die Messung der Fluoreszenz-Polarisation von DPH versetzten Membranen bestimmt (s. Methodik). Dabei wurde angenommen, daß das DPH sich gleichmäßig in der Membran verteilt. Lentz et al. (1980) konnten zeigen, daß das Verteilungsverhalten von DPH in Membranen nicht vom Sättigungsgrad der Fettsäuren, dem Cholesteringehalt oder dem physikalischen Zustand der Membran (gelartig bzw. flüssig-kristallin) abhängt.

Der gleiche lineare Zusammenhang fand sich beim Vergleich der Acylierungsgrade der Phospholipide mit den spezifischen Aktivitäten der Mg^{2+} -ATPase von Phospholipase- A_2 behandelten und reacylierten Thymozytenplasmamembranen. Dieser lineare Zusammenhang war unabhängig von der

Methode, mit der die Membranen vorbehandelt wurden. Der Acylierungsgrad der Phospholipide wurde in unseren Versuchen durch

- a) Abbau mit Phospholipase-A₂
- b) Reacylieren der abgebauten Phospholipide
- c) Acylieren der nativen Membranen

variiert. Dabei zeigte die eingebaute Fettsäure bei den Reacylierungsexperimenten keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase. Die Regulation der Mg^{2+} -ATPase ließ sich allein mit dem Acylierungsgrad beschreiben. Da der Acylierungsgrad einen linearen Zusammenhang mit der Fluidität zeigt, scheint diese einen direkten Einfluß auf die Mg^{2+} -ATPase zu haben. Nach Cooper und Shinitzky (Cooper et al., 1978) drückt sich die Mikroviskosität einer Membran im Phospholipid/Cholesterinverhältnis aus. Dieses änderte sich in unseren Versuchen jedoch nicht. Der fluidisierende Einfluß der Phospholipide wird durch die Acyl-Gruppen erbracht. Möglicherweise ist deshalb eine Wirkung des Diacylphospholipid/Cholesterinverhältnisses auf die Fluidität von Bedeutung. Entfernt man die 2-ständige Fettsäure der Phospholipide mit Phospholipase-A₂, so tritt eine Abnahme dieses Verhältnisses ein und erniedrigt so die Fluidität der Membranen. Dies würde bedeuten, daß die 1-ständige Acyl-Gruppe der Lysophospholipide keinen Einfluß auf die Fluidität der Membran zeigt. Rand et al. (1975) fanden in ihren Studien, daß Lysophosphatidylcholin mit Cholesterin einen stabilen Komplex im Verhältnis 1:1 bildet. Dabei schiebt sich das Cholesterinmolekül in die freie 2-Stellung des Lysophosphatidylcholins und bildet eine zylindrische Struktur. Dieser stabile Komplex hält das Lysophosphatidylcholin in der Doppelschicht und verhindert, daß sich Lysophosphatidylcholinmicellen bilden. Der Versuch, Erythrozytenghosts durch Zusatz von Lysophosphatidylcholin in einen fluiden Zustand zu versetzen, gelingt nicht (Kalkhoff, unveröffentlichte Ergebnisse). Benzyl-

Lysophosphatidylcholin erniedrigt jedoch unter gleichen Bedingungen die Fluidität der Erythrozytenghosts (Weltzien et al., 1976). Auch hier scheint sich das Prinzip zu bestätigen, daß Phospholipide in Membranen erst dann einen fluidisierenden Effekt ergeben, wenn die 2-Stellung z.B. durch eine Benzyl- oder Acyl-Gruppe besetzt ist. Dadurch wird der stabile Cholesterin-Lysophospholipid-Komplex gestört und das Diacylphospholipid/Cholesterinverhältnis, das für die Fluidität verantwortlich ist, erhöht.

Die Bedeutung des Diacylphospholipid/Cholesterinverhältnis wurde auch durch die Zunahme der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase mit dem Diacylphospholipid/Cholesterinverhältnis nach Inkubation der Thymozytenplasmamembranen mit Phospholipase- A_2 und Waschen mit Rinderserumalbumin belegt. Die Zunahme der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität der Thymozytenplasmamembranen bei erniedrigtem Acylierungsgrad der Phospholipide zeigt auf eine allgemeine Abhängigkeit des Enzyms von der Mikroviskosität hin. Dies bedeutet jedoch nicht, daß der Acylierungsgrad unter physiologischen Bedingungen einen regulierenden Einfluß auf die Mg^{2+} -ATPase der Thymozytenmembran haben muß. Ein Acylierungsgrad der Phospholipide von 30%, bei dem die Mg^{2+} -ATPase einen 2-fach erhöhten Wert zeigt, führt bei Zellen in vivo zur Zellyse. Brunner et al.(1977) konnten über die Auftrennung von Membranvesikeln der Thymozytenplasmamembran durch free-flow Elektrophorese zeigen, daß die höchste spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase in Membranareale mit niederem Phospholipid/Cholesterinverhältnis integriert ist. Möglicherweise läßt sich die Enzymaktivität der Mg^{2+} -ATPase in vivo durch Verschieben des Enzymkomplexes in Bereiche höherer Mikroviskosität regulieren.

Kimelberg (1975) konnte die Mg^{2+} -ATPase aus Kaninchennieren (outer medulla) durch Zusatz von Cholesterin in ihrer Aktivität steigern. Dies deutet auch hier auf eine erhöhte Mg^{2+} -ATPase-Aktivität bei erniedrigter

Fluidität hin. Ein Zusatz von Cholesterin zu unseren Membranen ergab ebenfalls eine Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase.

Die Bedeutung der Fluiditätsabhängigkeit der Mg^{2+} -ATPase wird im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Muskeldystrophie diskutiert. Dabei wird ein Defekt im Lipid-Metabolismus angenommen. Für Tiere, die angeboren ähnliche Symptome zeigten, konnte im Gewebe ein erhöhter Cholesteringehalt nachgewiesen werden. Die Mg^{2+} -ATPase dieser Gewebe lag um 160% höher als vergleichbare Gewebe gesunder Tiere ohne erhöhten Cholesteringehalt (Owens und Hughes, 1970).

Plasmamembranen von dystrophischen Muskel-, Leber- und Erythrozytenzellen zeigten eine 2-fach erhöhte Membranviskosität, die durch Fluoreszenzpolarisation mit Perylen bestimmt wurde (Sha'afi et al., 1975).

Roses et al. (1975) fanden im Gegensatz dazu durch Messungen der Elektronenspinresonanz eine erhöhte Fluidität von Erythrozyten bei Patienten mit Muskeldystrophie.

5.3 Wirkung der Arachidonsäure auf die Na^+ , K^+ -ATPase der Thymozytenplasmamembran

Lymphozyten zeigen in vivo und in vitro die Eigenschaft, nach Zugabe von Mitogenen wie ConA und PHA zu proliferieren. Dabei werden die Zellen aktiviert und zeigen Veränderungen im Metabolismus. Untersuchungen haben gezeigt, daß die Bindung des Mitogens mit den Rezeptoren der Plasmamembran ausreicht, den Lymphozyten aus dem Ruhezustand (G1-Phase) in einen aktivierten Zustand überzuführen. Eine Aufnahme des Mitogens in die Zelle ist dabei nicht erforderlich (Greaves und Bauminger, 1972). Es wird angenommen, daß der stimulierende Impuls des Mitogens von der Plasmamembran in die Zelle übertragen wird. Dieser Impuls muß sich bis zum Zellkern fortsetzen, wo dann die mitotische Zellteilung ausgelöst wird.

Nach Zugabe des Mitogens werden verschiedene Veränderungen im Metabolismus der Plasmamembran beobachtet und mit der Aktivierung des Lymphozyten in Beziehung gebracht. So konnte gezeigt werden, daß der Transport von K^+ -Ionen (Quastel und Kaplan, 1970; Wright et al., 1973), Ca^{2+} -Ionen (Whitney und Sutherland, 1972), Nukleotiden (Peters und Hansen, 1971a), Zuckern (Peters und Hansen, 1971b) und Aminosäuren (Mendelsohn et al., 1971; Van den Berg und Betel, 1973) nach Mitogengzugabe beschleunigt wird.

Daneben wurde auch eine erhöhte Glykoproteinsynthese (Haydn et al., 1970), eine Aktivierung des Phospholipidmetabolismus (Resch und Ferber, 1972; Fisher und Mueller, 1974) und ein veränderter cyclo-AMP bzw. ATP-Metabolismus (Krishnaraj und Talwar, 1973; de Robertis et al., 1974; Novogrodsky, 1972) festgestellt.

Der Mechanismus der Lymphozytenstimulation findet aus mehreren Gründen ein breites Interesse. Einmal kann die in vitro durchgeführte Stimulation der Lymphozyten als Modell für die Aktivierung ruhender Zellen zur Mitose und Differentiation gelten. Zum anderen gibt dieses System Einblick in die Erkennungs- und Proliferationsphase der Immunantwort. Trotz intensiver Suche ist es noch nicht gelungen, eine Folge von Vorgängen in der Plasmamembran für die folgende Proliferation verantwortlich zu machen.

Nach dem allgemeinen Prinzip der Struktur-Funktionswechselwirkung muß auch der Einfluß einer veränderten Membranstruktur auf die Membranfunktion diskutiert werden. Verschiedene Autoren fanden in diesem Zusammenhang einen direkten Einfluß der Fettsäuren von membrangebundenen Phospholipiden auf Membranfunktionen (Kruyff et al., 1973; Mc Elhany et al., 1973; Wilson und Fox, 1971; Schairer und Overath, 1969; Bloj et al., 1973; Goldemberg et al., 1973). Für verschiedene Spezies wurde die Fettsäurezusammensetzung ruhender und stimulierter Lymphozyten verglichen

(Ferber et al., 1975). Dabei konnte gezeigt werden, daß Phosphatidylcholin ruhender Lymphozyten relativ geringe Mengen polyungesättigter Fettsäuren (18:2, 20:4) und Stearinsäure enthält. Dies wird durch einen erhöhten Gehalt an Palmitinsäure ausgeglichen. Bei Stimulation der Lymphozyten mit ConA konnte nach 4 Stunden Inkubation in 2-Stellung von Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin ein erhöhter Gehalt an Arachidonsäure nachgewiesen werden. Während die *de novo* Synthese von Phospholipiden erst 6 Stunden nach der Stimulation ansteigt (Fisher und Mueller, 1969), findet man schon innerhalb der ersten Stunde einen erhöhten Einbau von ungesättigten Fettsäuren in die Membranphospholipide (Resch und Ferber, 1972; Resch et al., 1972). Der Einbau von langkettigen Fettsäuren übersteigt die *de novo* Synthese um das 100-fache. Für Ölsäure konnte innerhalb von 10 Minuten nach der Stimulation der Lymphozyten mit PHA ein 3-facher Einbau im Vergleich zu ruhenden Lymphozyten gemessen werden (Ferber et al., 1980). Diese Diskrepanz zwischen der *de novo* Synthese von Phospholipiden und dem Fettsäureeinbau kann über den von Lands vorgeschlagenen Austausch von Fettsäuren unabhängig von einer *de novo* Synthese erklärt werden (Lands, 1960; Lands und Merkel, 1963; Lands und Hart, 1965). Die an die Lymphozytenplasmamembran gebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase zeigt eine hohe Spezifität für ungesättigte Fettsäuren und hierbei besonders für Arachidonsäure (Ferber und Resch, 1973; Ferber et al., 1976). Diese Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase zeigt nach Stimulation von Lymphozyten mit PHA eine 2- bis 3-fach erhöhte spezifische Aktivität (Ferber und Resch, 1972). So läßt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Wirkung des Mitogens auf die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase und der veränderten Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide aufstellen. Dabei ist nicht gesagt, daß diese Acyltransferase direkt als Rezeptor für das Mitogen

dient oder auch nur in indirekter topographischer Nachbarschaft des Rezeptors liegt (Ferber et al., 1976).

Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Funktion der von dieser Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase eingebauten Arachidonsäure auf die Membranfunktion zu untersuchen. Dabei wurde vermutet, daß durch die bei Einbau von Arachidonsäure gefundene Fluiditätserhöhung der Plasmamembran ein stimulierender Effekt auf membrangebundene Enzyme ausgeübt wird. Bei der Stimulation von Lymphozyten wird eine Zunahme der Fluidität der Plasmamembran beobachtet (Ferber et al., 1974; Barnett et al., 1974).

5.3.1 Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase in nativen Thymozytenplasmamembranen nach Einbau von Arachidonsäure

Für die Aktivität der Mg^{2+} -ATPase konnte kein Einfluß der in die Plasmamembran eingebauten Arachidonsäure beobachtet werden. Diese Membranaktivität war vom Acylierungsgrad der Phospholipide und damit von der Membranfluidität abhängig. Bei Acylierung der vorher mit Phospholipase- A_2 hydrolysierten Membranphospholipiden sank die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase unabhängig von der Fettsäure linear mit zunehmendem Acylierungsgrad.

Die Na^+ , K^+ -ATPase in Thymozytenplasmamembranen zeigte dagegen ein völlig anderes Verhalten bei der Regulation der Enzymaktivität. Bei Acylierung von nicht mit Phospholipase- A_2 behandelten Thymozytenplasmamembranen mit Arachidonoyl-CoA ergab sich eine starke Erhöhung der Gesamt-ATPase auf 180%. Dabei war die gesamte Aktivierung durch Ouabain hemmbar. Der ouabainhemmbare Anteil der Gesamt-ATPase wird

definitionsgemäß einer Na^+ , K^+ -ATPase zugeschrieben (Robinson und Flashner, 1979). Die Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase betrug ungefähr das 10-fache der in nativen Membranen gefundenen Enzymaktivität.

Unter gleichen Bedingungen zeigte die Acylierung von Thymozytenplasmamembranen mit Oleoyl-CoA nur eine Aktivierung der Gesamt-ATPase um 22%.

Diese durch Ouabain hemmbare Aktivierung der Gesamt-ATPase gleicht dem Verhalten von Lymphozytenplasmamembranen aus Schweinelymphknoten. Diese zeigten bei Zugabe von Desoxycholat eine Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase (Dornand et al., 1974). Eine solche Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase mit Desoxycholat konnte in Thymozytenplasmamembranen nicht nachgewiesen werden (Ferber, unveröffentlichte Ergebnisse).

Kimelberg (1975) diskutiert für die Na^+ , K^+ -ATPase aus Kaninchennieren eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Membranfluidität. Bei höherer Mikroviskosität fand er eine erniedrigte Aktivität des Enzyms. Durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen von Arachidonoyl-CoA und Oleoyl-CoA behandelten Thymozytenmembranen konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung der Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität in unserem System nicht auf die höhere Fluidität nach Acylierung mit Arachidonoyl-CoA zurückgeführt werden kann. Die Fluidität der Thymozytenplasmamembranen stieg zwar stetig mit erhöhtem Einbau von Arachidonsäure in die Membranphospholipide, zeigte aber keinen Unterschied über das gesamte Temperaturspektrum von 12°C bis 40°C zwischen der Acylierung mit Arachidonoyl-CoA und Oleoyl-CoA. Ein solcher Unterschied müßte jedoch zu beobachten sein, wenn die Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität mit der Fluidität korreliert.

Durch Acylierung der Thymozytenmembranen mit Arachidonoyl-CoA bzw. Oleoyl-CoA ließ sich die Fluidität der Membranen erhöhen, die Flußaktivierungsenergie (s. Methodik) zeigte jedoch keine Veränderungen. Inwieweit

die Änderung der Flußaktivierungsenergie nativer Thymozytenmembranen bei 34°C auf einen Phasenübergang zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht.

Die Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase nach Zugabe von Arachidonoyl-CoA zu nativen Thymozytenplasmamembranen kann einerseits durch eingebaute Arachidonsäure, aber auch durch freie Arachidonsäure bzw. Arachidonoyl-CoA hervorgerufen werden. Die Art des Arachidonsäure-Angebotes, durch welche die Na^+ , K^+ -ATPase aktiviert wird, wurde durch Waschen der Thymozytenmembranen mit Rinderserumalbumin näher untersucht. Dabei wurde angenommen, daß sowohl freie Arachidonsäure wie auch restliches Arachidonoyl-CoA aus der Membran herausgewaschen wird (Fiehn und Hasselbach, 1970). Durch dieses Verfahren konnte die in unserem System durch Arachidonoyl-CoA aktivierte Na^+ , K^+ -ATPase nicht inaktiviert werden. Das Waschen mit 1,6- bzw. 3,2 % Rinderserumalbumin zeigte keinen Verlust an spezifischer Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase. Dies läßt einen unspezifischen Detergenzeffekt des Arachidonoyl-CoA als Ursache für die Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase unwahrscheinlich erscheinen.

Da gezeigt werden konnte, daß das über die membrangebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase aus Lysophosphatidylcholin gebildete Phosphatidylcholin leichter als das übrige in der Membran enthaltene Phosphatidylcholin mit Phospholipase- A_2 hydrolysiert werden kann, wurden die Na^+ , K^+ -ATPase-aktivierten Membranen mit niedrigen Konzentrationen an Phospholipase- A_2 inkubiert. Dabei nahm die Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität reversibel zur Aktivierung durch Arachidonoyl-CoA wieder ab. Dies deutet darauf hin, daß die in die Thymozytenplasmamembranen eingebaute Arachidonsäure für die Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase verantwortlich ist. Wird die Arachidonsäure im Laufe der Lymphozytenaktivierung wieder von der Plasmamembran abgespalten, so könnte dies den

Abschluß der Lymphozytenproliferation auslösen. Die Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität der Thymozytenplasmamembranen wird dadurch wieder auf den Ausgangswert erniedrigt.

Ferraris und De Robertis (1974) konnten zeigen, daß im späten Stadium der Mitogenwirkung verstärkt Prostaglandin E auftritt, welches die Synthese von DNA stark hemmt. Da die Prostaglandine im Stoffwechsel aus freier Arachidonsäure gebildet werden, könnte so eine doppelte Regulation der Lymphozytenproliferation durch freigesetzte Arachidonsäure vermutet werden. Parker et al., diskutieren einen stimulierenden Einfluß von Arachidonsäure auf die Mitogenantwort von Lymphozyten als eine Folge der Wirkung von Prostaglandinvorstufen.

Indomethacin und andere Inhibitoren des Arachidonsäure-Stoffwechsels zeigten in diesem Zusammenhang einen hemmenden Einfluß auf die Lymphozytenstimulation (Kelly und Parker, 1979; Kelly et al., 1979; Parker et al., 1979).

Andere Studien zeigten im Gegensatz dazu für kleinere Indomethacinkonzentrationen einen verstärkenden Effekt auf die Mitogenantwort von Lymphozyten (Goodwin et al., 1977).

5.3.2 Die Bedeutung der Na^+ , K^+ -ATPase für die Lymphozytenstimulation

Kaplan et al. konnten zeigen, daß der Zusatz von Ouabain zu stimulierten Lymphozyten sowohl die DNA, RNA wie auch die Proteinsynthese hemmt. Diese Hemmung läßt sich durch Waschen mit überschüssigen K^+ -Ionen wieder rückgängig machen (Quastel und Kaplan, 1968). Die Wirkung des Ouabains, einem spezifischen Inhibitor für die Na^+ , K^+ -ATPase auf stimulierte Lymphozyten wurde mit einem erniedrigten Na^+ , K^+ -Ionenfluß durch die Plasmamembran in Verbindung gebracht. Nach der Stimulation

von Lymphozyten mit PHA konnte ein auf das Doppelte erhöhter Kaliumfluß in die Zelle gemessen werden (Quastel und Kaplan, 1970).

Später durchgeführte Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß die Zelle vor und nach der Stimulation ein konstantes K^+/Na^+ -Verhältnis zeigt. Die Zunahme des Kaliumflusses in die Zelle wird durch einen unspezifischen, von einer Ionenpumpe unabhängigen Kaliumfluß aus der Zelle ausgeglichen (Segel und Lichtman, 1976).

Über die Bedeutung dieses energieaufwendigen Transports von Ionen ohne Änderung absoluter Ionenkonzentrationen kann bisher nur spekuliert werden. Neben einem gekoppelten Transport von Aminosäuren bei erhöhtem Austritt von K^+ -Ionen aus der Zelle wird ein allgemeiner Vorteil einer erhöhten Durchlässigkeit der Lymphozytenmembran z.B. für Lymphokine diskutiert. Dabei müßte gleichzeitig ein erhöhter Austritt von Ionen durch eine größere Ionenpumpenaktivität wieder ausgeglichen werden (Kaplan, 1979).

Möglicherweise erhöht der Arachidonsäureeinbau in Plasmamembranen stimulierter Lymphozyten die Durchlässigkeit für verschiedene Moleküle und bewirkt gleichzeitig über eine erhöhte Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität, daß der Na^+/K^+ -Ionengradient der Zelle erhalten bleibt. Dabei muß nicht unbedingt die Struktur der eingebauten Arachidonsäure für die größere Durchlässigkeit der Plasmamembran verantwortlich sein. Nach erhöhtem K^+ -Transport in die Zelle als Folge der aktivierten Na^+ , K^+ -ATPase durch die Arachidonsäure könnte der dadurch erhöhte Diffusionsdruck in der Zelle die Membran zu kurzzeitiger Porenbildung anregen. Die Erhöhung der plasmamembrangebundenen Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität bei Stimulation der Lymphozyten mit ConA wird von Quastel et al. (1975) über das Zusammenlagern vorgebildeter Transportuntereinheiten in der Membran erklärt.

Averdunk und Lauf (1975) diskutieren den erhöhten Ionenfluß über eine höhere Aktivität der einzelnen Pumpe und nicht über die Bereitstellung neuer Transportproteine.

Die Bedeutung der von uns gefundenen erhöhten Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität als Folge der Acylierung von Lysophospholipiden der Thymozytenplasmamembran mit Arachidonsäure in vivo läßt sich aus unseren Experimenten nicht endgültig beschreiben. Verschiedene Autoren fanden neben der erhöhten Aktivität der plasmamembrangebundenen Na^+ , K^+ -ATPase bei Stimulation von Lymphozyten mit ConA auch eine, wenn auch geringe, Aktivierung dieser Membranaktivität nach Inkubation gereinigter Lymphozytenplasmamembranen mit ConA. Dies könnte auf eine direkte Einwirkung des ConA-Rezeptor-Komplexes auf die Na^+ , K^+ -ATPase ohne Zwischenschaltung des Phospholipid-Metabolismus deuten (Averdunk et al., 1976; Pommier et al., 1975).

5.4 Deacylierung von Phospholipiden beim Austausch von Fettsäuren in Thymozytenplasmamembranen

Der Einbau von Arachidonsäure in Phosphatidylcholin und Phosphatidyl-
äthanolamin der Thymozytenplasmamembranen nach Stimulation mit ConA verläuft nicht über eine de novo Synthese der Phospholipide, sondern über eine Acylierung der entsprechenden Lysophospholipide mit Hilfe der membrangebundenen Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase (Ferber und Resch, 1976). Dabei unterliegt die Aktivität dieses Enzyms einer direkten Regulation durch das stimulierende Lectin (Ferber und Resch, 1973). In diesem Zusammenhang wird der Austausch gesättigter gegen ungesättigte Fettsäuren der Phospholipide über den Lands-Zyklus diskutiert. Dieser von Robertson und Lands (1964) beschriebene Stoff-

Stoffwechselwege des Phosphatidylcholin

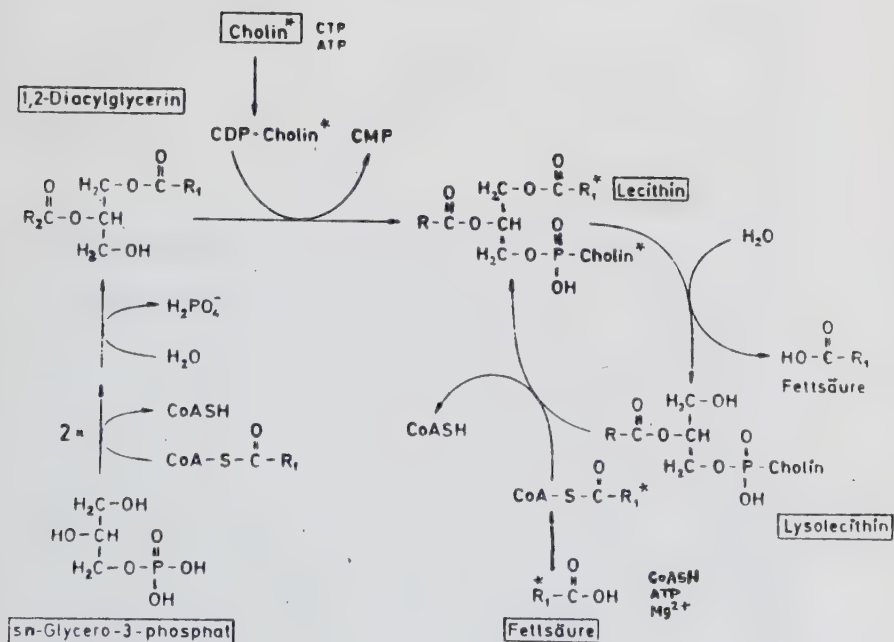
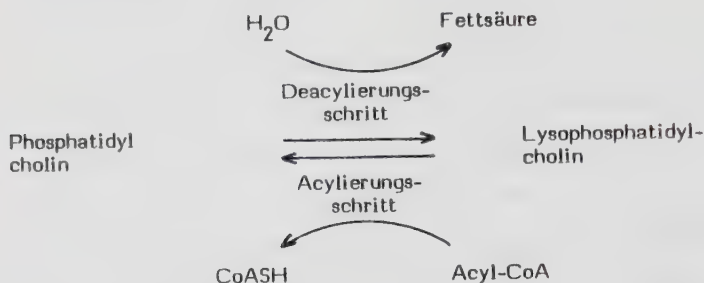


Abb. 5.4.1

Phosphatidylcholin = Lecithin

(Ferber und Resch, 1976)

wechselweg in Leberzellen zeigt, daß Fettsäuren durch einen Deacylierungs-Reacylierungsmechanismus ausgetauscht werden können.



Während für die Thymozytenplasmamembranen der Acylierungsschritt gut untersucht und beschrieben ist, liegen die Verhältnisse für die Deacylierung der Phospholipide noch im Dunkeln. Versuche, eine Phospholipase- A_2 in Thymozytenplasmamembranen nachzuweisen, waren bisher nicht erfolgreich. Sollte eine solche bisher nicht gefundene Phospholipase- A_2 für den Deacylierungsschritt verantwortlich sein, so müßten an diese besondere Bedingungen gestellt werden. Da der Austausch gesättigter gegen ungesättigte Fettsäuren in Phospholipiden der Thymozytenplasmamembran durch Lectine stimuliert werden kann, müßte auch die Bildung von Lysophospholipiden durch Lectine in gleicher Weise reguliert werden, wie die gut beschriebene Acylierung durch die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase.

Daß ein zweistufiger Stoffwechselzyklus an zwei Stellen in der gleichen Richtung reguliert wird, erscheint unter ökonomischen Gesichtspunkten eher als unwahrscheinlich. Eine unregulierte Phospholipase- A_2 Aktivität würde jedoch im unstimulierten Zustand der Zelle eine Überproduktion an Lysophospholipiden bewirken, da das thermodynamische Gleichgewicht einer Lipase-Reaktion ganz auf der Seite der Produktbildung liegt.

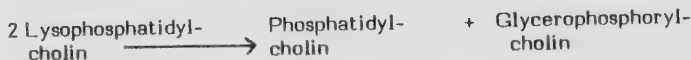
Ein System, das Lysophospholipide über ein Gleichgewicht bei Unterschreitung einer bestimmten Gleichgewichtskonzentration nachbildet, wäre für den Austausch gesättigter gegen ungesättigte Fettsäuren von großem Vorteil. In diesem Fall würde die Regulation der Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase durch Lectine bei der Stimulation von Lymphozyten ausreichen.

Bei dieser Betrachtung ist es von Bedeutung, daß trotz der Anwesenheit einer Lysophospholipase der Lysophospholipidanteil in den von uns betrachteten Thymozytenplasmamembranen konstant bei 8% der Phospholipide lag. Dies deutet auf ein Gleichgewicht zwischen Abbau des Lysophosphatidylcholins zu Glycerophosphorylcholin und Nachbildung von Lysophosphatidylcholin bis zu der Gleichgewichtskonzentration hin. Diese Nachbildung von Lysophosphatidylcholin konnte in unseren Versuchen durch Inkubation von Thymozytenplasmamembranen mit radioaktiv markiertem Lysophosphatidylcholin bestätigt werden. Die Analyse der radioaktiv markierten Produkte zeigte nach 3 Stunden Inkubation einen vollständigen Abbau des Lysophosphatidylcholins zu Glycerophosphatidylcholin. Wurde der gleiche Ansatz nicht über die radioaktiv markierten Produkte, sondern über eine direkte Analyse der Phospholipide untersucht, so zeigte sich, daß sogar mehr Lysophosphatidylcholin nachgebildet, als durch Hydrolyse abgebaut, wurde.

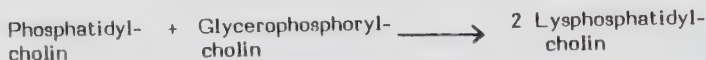
Die weitere Bildung von Lysophosphatidylcholin nach Lysophosphatidylcholinzugabe zu Thymozytenplasmamembranen deutet darauf hin, daß die an sich konstante Gleichgewichtskonzentration von Lysophosphatidylcholin durch sich selbst oder einen Metaboliten reguliert werden kann.

Erbland und Marinetti (1965) fanden in zellfreien Überständen von Leberhomogenat eine Reaktion, durch die Lysophosphatidylcholin durch Trans-

acylierung in Phosphatidylcholin und Glycerophosphorylcholin überführt werden kann:



Da während einer Transacylierung keine große Änderung der freien Energie zu erwarten ist, sollte diese Reaktion unter thermodynamischen Bedingungen auch in umgekehrter Richtung ablaufen können:



Solche günstigen Bedingungen liegen in der Thymozytenplasmamembran nach Stimulation mit Lectinen vor. Da die Acylierung von Lysophosphatidylcholin durch die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase aktiviert wird, sinkt die Konzentration an Lysophosphatidylcholin in der Membran. Andererseits ist der Gehalt der Thymozytenplasmamembran an Phosphatidylcholin so hoch, daß bei Anwesenheit von Glycerophosphorylcholin eine Nachbildung von Lysophosphatidylcholin aus Phosphatidylcholin thermodynamisch günstig wäre.

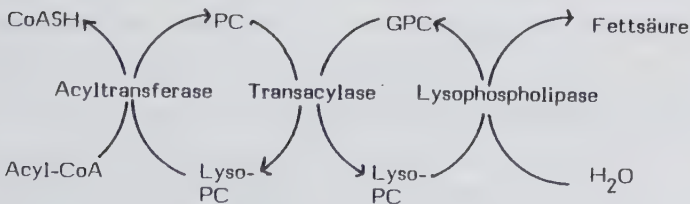
Sollte die Transacylierung einer Fettsäure von Phosphatidylcholin auf Glycerophosphorylcholin in der Thymozytenplasmamembran von Bedeutung sein, so müßte auch durch exogenen Zusatz von Glycerophosphorylcholin über die Störung des Gleichgewichts Phosphatidylcholin abgebaut werden können.

Ein solcher Effekt konnte von uns gezeigt werden. Nach Zugabe von Glycerophosphorylcholin zu Thymozytenplasmamembranen wurde ein Abbau sowohl von Phosphatidylcholin wie auch von Phosphatidyläthanolamin beobachtet (Fig. 4.6.2 und 4.6.3).

Das für die Bildung von Lysophosphatidylcholin in einer Gleichgewichtsreaktion notwendige Glycerophosphorylcholin kann in Thymozytenplasmamembranen von Lysophosphatidylcholin selbst durch die in der Membran gut beschriebenen Lysophospholipase bereitgestellt werden:

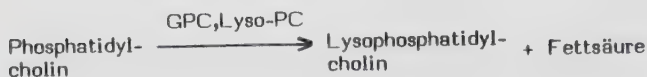


Da die Thymozytenplasmamembran nur wenig Lysophosphatidylcholin enthält, ist die Bildung von Glycerophosphorylcholin in der Plasmamembran von ruhenden Zellen wahrscheinlich gering. Die geringe Konzentration an Glycerophosphorylcholin verhindert, daß Phosphatidylcholin über das beschriebene Gleichgewicht Lysophosphatidylcholin überführt wird. Erst bei erniedrigter Lysophosphatidylcholin-Konzentration in der Membran, z.B. bei erhöhter Acyltransferase-Aktivität, könnte die Transacylierung einer Fettsäure von Phosphatidylcholin auf Glycerophosphorylcholin eine Bedeutung erlangen. Da dabei aus einem Phosphatidylcholinmolekül zwei Lysophosphatidylcholinmoleküle entstehen, kann ein Teil dieses Lysophosphatidylcholins für die Acylierung verwendet werden, während ein anderer Teil über die Lysophospholipase Glycerophosphorylcholin nachbildet, welches dann wieder, unterstützt durch die lokale Konzentrationserhöhung, eine Fettsäure von Phosphatidylcholin übernehmen kann:



PC = Phosphatidylcholin
 Lyso-PC = Lysophosphatidylcholin
 GPC = Glycerophosphorylcholin

Betrachtet man diesen Reaktionszyklus unter formalen Gesichtspunkten, so handelt es sich um eine hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin in Lysophosphatidylcholin unter der katalytischen Wirkung von Lysophosphatidylcholin bzw. Glycerophosphorylcholin:



Eine solche Reaktion entspricht den oben beschriebenen Bedingungen für den Deacylierungsschritt im Lands-Zyklus.

Da Glycerophosphorylcholin keinen hydrophoben Anteil in seiner molekularen Struktur besitzt, ist es gut wasserlöslich und wird nur kurzzeitig nach der Bildung in lokal erhöhter Konzentration im Bereich der Plasmamembran vorliegen, um als Akzeptor für die Fettsäure des Phosphatidylcholins wirken zu können. Aus dieser Sicht könnte man sich vorstellen, daß es nicht genügt, Lysophosphatidylcholin durch Acylieren aus dem Gleichgewicht zu nehmen, um so Phosphatidylcholin durch Transacylierung einer Fettsäure auf Glycerophosphorylcholin in Lysophosphatidylcholin überzuführen.

Einen Hinweis auf ein solches Verhalten der Thymozytenplasmamembranen zeigen unsere Versuche zur Acylierung von Lysophosphatidylcholin durch Inkubation mit Arachidonoyl-CoA (Fig. 4.6.4 und 4.6.5). Erst der Zusatz kleinerer Mengen von Lysophosphatidylcholin (30 nMol/mg Protein) ergab einen Abbau von Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin.

Mengenmäßig wurde Phosphatidylcholin um 8% und Phosphatidyläthanolamin um 23% abgebaut. Bei steigendem Zusatz von Lysophosphatidylcholin zu den mit Arachidonoyl-CoA inkubierten Thymozytenplasmamembranen erhöhte sich der Gehalt an Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin wieder, um dann ein Plateau zu bilden (s. Fig. 4.6.4 und 4.6.5). In diesem

Bereich ist der Abbau und die Neubildung von Phosphatidylcholin mengenmäßig ausgeglichen. Versuche, bei denen unter gleichen Bedingungen radioaktiv markiertes Lysophosphatidylcholin zugesetzt wurde, haben gezeigt, daß dieses zu 80% in Phosphatidylcholin übergeführt wird.

Diese hier beschriebenen Versuche können nur so verstanden werden, daß neben der bekannten Acylierung von Lysophospholipiden über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase synchron in gleichem Ausmaß Lysophospholipide aus Phosphatidylcholin bzw. Phosphatidyläthanolamin wieder nachgebildet werden. Die Versuche zeigen, daß zur Einleitung dieser Reaktion eine katalytische Menge Lysophosphatidylcholin bzw. Glycerophosphorylcholin der Membran vorgelegt werden muß, um einen Deacylierungs-Reacylierungsmechanismus auszulösen.

Hierin könnte eine der Aufgaben der für die Lymphozyten-Stimulation notwendigen Wechselwirkung mit Makrophagen liegen. Man könnte sich ein Modell vorstellen, in dem die Lectine die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase aktivieren und so eine Acylierung von Lysophospholipiden in Lymphozytenplasmamembranen mit ungesättigten Fettsäuren ermöglichen. Die für den Deacylierungsschritt notwendige katalytische Konzentration an Lysophospholipid könnte durch die in der Makrophagenmembran enthaltenen Phospholipase- A_2 bereitgestellt werden. Durch ein Zusammenspiel zwischen Lectin, Lymphozyt und Makrophagen könnten gesättigte Fettsäuren in der Lymphozytenplasmamembran gegen ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) ausgetauscht werden.

Die Wirkung dieser ungesättigten Fettsäuren auf plasmamembrangebundene Enzyme (z.B. Na^+ , K^+ -ATPase, s. Kap. 5.3) könnte dann die Information zur Proliferation ins Zellinnere übertragen.

Da nach einiger Zeit auch die neu eingebaute Arachidonsäure dem Deacylierungsschritt unterworfen wäre, kann nach diesem Modell auch freie Arachidonsäure entstehen, welche über mehrere Schritte in Prostaglandine überführt werden kann. Diese Prostaglandine können die Lymphozytenstimulation hemmen (s. Kap. 5.3) und so möglicherweise den Abschluß der Zellaktivierung nach Lectinzugabe bewirken.

Inwieweit ein solches Modell den Ablauf der Lymphozytenstimulation beschreiben kann, muß durch weitere Untersuchungen erhärtet und bestätigt werden.

Unsere Versuche haben mehrfach gezeigt, daß das Bild des Lipidmetabolismus durch Anwendung einer einzigen Untersuchungstechnik nur ungenügend untersucht werden kann. Bei der Betrachtung des Stoffwechsels von radioaktiv markierten Substraten ergab sich für unser System der Thymozytenplasmamembran mehrfach eine Diskrepanz mit Techniken, die den Stoffwechsel des gesamten Substratpools bestimmen. Ein Beispiel dafür ist die in diesem Kapitel beschriebene Bildung von zusätzlichem Substrat über die Verschiebung eines Gleichgewichtes.

Das von Erbland und Marinetti (1965) beschriebene System der Transacylierung einer Fettsäure von Lysophosphatidylcholin auf ein zweites Lysophosphatidylcholinmolekül unter Bildung von Phosphatidylcholin läßt sich in gleicher Weise wie unsere Versuchsergebnisse diskutieren. Der hydrolytische Abbau von Lysophosphatidylcholin kann auch hier in einem Zweistufenprozeß ablaufen. In einem ersten Schritt erfolgt die Übertragung einer Fettsäure und in einem weiteren Schritt der hydrolytische Abbau des entstandenen Phosphatidylcholins durch eine Phospholipase A_2 .

Auch für die spezifische Freisetzung bestimmter Fettsäuren wird in der Literatur ein Zweistufenmechanismus beschrieben. Irving und Dawson (1979) beobachteten für Mikrosomen aus Rattenleber den Transfer einer Fettsäure von Phosphatidylcholin auf Lysophosphatidylinositol. Diese Reaktion zeigt eine hohe Spezifität für Arachidonsäure und ist von der Coenzym A-Konzentration abhängig. Die Autoren diskutieren diese Reaktion als Umkehrung der für die Arachidonsäure spezifischen Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferasereaktion unter intermediärer Bildung von Acyl-CoA als Zwischenprodukt. Die Bedeutung dieses Mechanismus in vivo wird von den Autoren als Möglichkeit der spezifischen Freisetzung von Arachidonsäure aus Phosphatidylcholin nach Übertragung der Arachidonsäure auf Phosphatidylinositol diskutiert. Phosphatidylinositol zeigt im Vergleich zu Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin einen hohen Phospholipidmetabolismus. Der Metabolismus des Phosphatidylinositols läßt sich durch äußere Signale stimulieren. Eine solche Stimulation wird z.B. im Nervengewebe durch Neurotransmitter oder elektrische Impulse, in Makrophagen durch phagozytiserbare Teilchen und in Fettzellen durch Insulin bewirkt (Gurr und James, 1975). Die aus dem Phosphatidylinositol freigesetzte Arachidonsäure kann als Vorstufe für die Prostaglandinsynthese dienen.

Möglicherweise zeigt sich für die in diesem Kapitel dargestellten Beispiele der Regulation der Freisetzung von Fettsäuren aus Phospholipiden ein allgemeiner geltendes System. Für den Abbau wird nicht ein Enzym eingesetzt, das direkt das Substrat metabolisiert, sondern ein Enzym, das erst über eine Transacylierung erreicht wird.

Die Trennung von Substrat und Enzym beim Abbau von Phospholipiden wird auch in räumlicher Beziehung beobachtet. Membrangebundene Phosphatidsäure wird besonders durch lösliche Hydrolasen abgebaut, während ungebundene Phosphatidsäure bevorzugt von membrangebundenen Hydrolasen metabolisiert wird (Gutt und James, 1975).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Verfahren entwickelt, das erlaubt, Fettsäuren in Phospholipiden der Thymozytenplasmamembran spezifisch auszutauschen. In einem ersten Schritt wurde Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin mit Phospholipase A_2 deacyliert. Nach Entfernen der Phospholipase A_2 durch Waschen der Membranen ließen sich die Lysophospholipide durch verschiedene Acyl-CoA (Arachidonoyl-CoA, Oleoyl-CoA, Palmitoyl-CoA) über die membrangebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase enzymatisch reacylieren. Durch diese Technik wurde der Phospholipidgehalt der Membran nicht beeinflußt.

Eine simultane Reaktionsfolge der Deacylierung von Phospholipiden mit Phospholipase A_2 und der Reacylierung über die membrangebundene Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase ergab keinen Austausch von Fettsäuren. Es konnte gezeigt werden, daß die über die Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase in die Phospholipide eingebauten Fettsäuren bevorzugt durch die Phospholipase A_2 wieder freigesetzt werden.

Für die Thymozytenplasmamembran wurden Zusammenhänge zwischen der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase, dem Acylierungsgrad der membrangebundenen Phospholipide und der Membrannmikroviskosität untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Mikroviskosität der Thymozytenplasmamembran nach Inkubation mit Phospholipase A_2 linear mit abnehmendem Acylierungsgrad der Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin ansteigt. Das läßt sich dadurch erklären, daß die gebildeten Lysophospholipide mit Cholesterin einen engen Komplex bilden und daß so die fluidisierende Wirkung auf die Membran neutralisiert wird.

Der Zusammenhang zwischen dem Acylierungsgrad der Phospholipide und der Membranfluidität läßt sich als spezieller Fall des bekannten Einflusses des Phospholipid/Cholesterinverhältnisses auf die Membran diskutieren. Bei Abnahme dieses Verhältnisses steigt die Mikroviskosität von Membranen ebenfalls linear an.

Durch den spezifischen Austausch von Fettsäuren der Phospholipide in der Thymozytenplasmamembran über den beschriebenen Deacylierungs-Reacylierungsmechanismus konnte gezeigt werden, daß die spezifische Aktivität der membrangebundenen Mg^{2+} -ATPase nicht durch die Struktur der Fettsäure der membrangebundenen Phospholipide beeinflusst wird. Die Aktivität des Enzyms zeigt die lineare Korrelation mit dem Acylierungsgrad des Phosphatidylcholins und Phosphatidyläthanolamins unabhängig von der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide. Dies gilt für native Membranen, Phospholipase A_2 behandelte Membranen, wie auch für Membranen, in denen Lysophospholipide enzymatisch reacyliert wurden. Bei den Reacylierungsexperimenten war nur der steigende Acylierungsgrad für die Abnahme der spezifischen Aktivität der Mg^{2+} -ATPase verantwortlich.

Da gezeigt werden konnte, daß sowohl die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -ATPase wie auch die Mikroviskosität der Thymozytenplasmamembran linear vom Acylierungsgrad der Membranphospholipide abhängt, wird ein direkter Einfluß der Mikroviskosität auf die Mg^{2+} -ATPase diskutiert. Bei steigender Mikroviskosität der Membran steigt auch die Aktivität der Mg^{2+} -ATPase.

Die Aktivierung der Mg^{2+} -ATPase ließ sich durch Entfernen der Hydrolyse-Produkte nach Inkubation der Thymozytenplasmamembran mit Phospholipase A_2 noch weiter erhöhen. Die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -

ATPase zeigte in diesen Versuchen eine negative lineare Abhängigkeit vom Phospholipid/Cholesterinverhältnis.

Für die Aktivität der Mg^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskel wird im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine positive Abhängigkeit vom Phospholipidgehalt der Membran diskutiert. Entfernt man Phospholipide dieser Membran durch Inkubation mit Phospholipase A_2 und Waschen mit Rinderserumalbumin, so zeigt die Mg^{2+} -ATPase keine Aktivität mehr (Swoboda et al., 1979).

Im Gegensatz zur fettsäureunabhängigen Regulation der Mg^{2+} -ATPase der Thymozytenplasmamembran über die Mikroviskosität wurde für die Na^+ , K^+ -ATPase eine fettsäurespezifische Regulation gefunden.

Durch den Einbau von geringen Mengen an Arachidonsäure in Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin nativer Thymozytenplasmamembranen ohne vorherige Phospholipase- A_2 -Behandlung ließ sich die membrangebundene Na^+ , K^+ -ATPase um das 10-fache aktivieren (von 4,0 nMol/mg · min auf 39 nMol/mg · min). Diese Aktivierung ließ sich nur durch die Arachidonsäure auslösen. Ölsäure zeigte nur eine geringe Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase.

Die Aktivierung dieses Enzyms ließ sich durch Inkubation mit kleinen Konzentrationen an Phospholipase A_2 wieder rückgängig machen. Das Waschen der Membranen mit Albumin zeigte dagegen keine Änderung der Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität. Dies zeigt, daß nur die in die Phospholipide eingebaute Arachidonsäure und nicht Arachidonoyl-CoA oder freie Arachidonsäure für die Aktivierung des Enzyms verantwortlich ist.

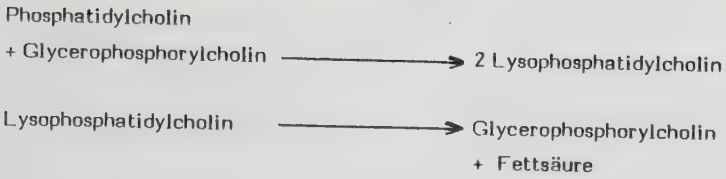
Die Steigerung der Na^+ , K^+ -ATPase bei dem Einbau von Arachidonsäure in die Phospholipide der nativen Thymozytenplasmamembran ließ sich nicht durch die Abnahme der Mikroviskosität der Membran erklären, da die Änderung der Mikroviskosität der Thymozytenplasmamembran bei dem Einbau von Arachidonsäure und Ölsäure in die Phospholipide ebenso groß war.

Für die Stimulation von Lymphozyten durch Lectine wird ein kausaler Zusammenhang zwischen der Mitogenbindung und den Rezeptor und der Aktivierung der Na^+ , K^+ -ATPase diskutiert:

Durch die Bindung des Lectins an den Rezeptor wird eine für die Arachidonsäure spezifische Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholinacyltransferase aktiviert (Ferber et al., 1973). Diese baut Arachidonsäure in die Phospholipide der Lymphozytenplasmamembran ein. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß auf diesem Weg eine membrangebundene Na^+ , K^+ -ATPase aktiviert werden kann. Dieser wird die Aufgabe einer Ionenpumpe für Na^+ - und K^+ -Ionen zugeschrieben.

Für die Bildung von acylierbaren Lysophospholipiden im Rahmen der Änderung der Fettsäurezusammensetzung von Phospholipiden in der Thymozytenplasmamembran wird ein alternativer, von einer Phospholipase A_2 unabhängiger Weg beschrieben.

Dieser verläuft über eine Transacylierung einer Fettsäure von Phosphatidylcholin bzw. Phosphatidyläthanolamin auf Glycerophosphorylcholin. Durch anschließende Hydrolyse des entstandenen Lysophosphatidylcholins durch die membrangebundene Lysophospholipase läßt sich das Glycerophosphorylcholin wieder zurückgewinnen.



Andere Beispiele aus der Literatur legen die Vermutung nahe, daß hinter diesem zweistufigen Abbau von Phospholipiden ein allgemeiner gültiges Prinzip steht:

Für den hydrolytischen Abbau von Phospholipiden wird nicht ein Enzym eingesetzt, das direkt das Substrat metabolisiert, sondern ein Enzym, das erst über eine Transacylierung erreicht wird.

7. MATERIALIEN UND GERÄTE

Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Aktivkohle Norit A	Serva, Heidelberg
Ammoniumhepta- molybdat	E. Merck, Darmstadt
Aquasol-2	New England Nuclear, Boston, U.S.A
Arachidonoyl-CoA	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Cholesterin	Sigma, St. Louis, U.S.A
DPH (1,6-Diphenyl hexatrien)	Aldrich-Europe, Nettetal
DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitro- benzoesäure))	Sigma, St. Louis, U.S.A
EDTA (Äthylendiamintetraessig- säure, Dinatriumsalz)	E. Merck, Darmstadt
Glycerophosphorylcholin	Sigma, St. Louis, U.S.A
HEPES (N-2-Hydroxyäthylpiperazin N'-2 Äthansulfonsäure)	C. Roth, Karlsruhe
Lysophosphatidyläthanolamin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Lysophosphatidylcholin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Ninhydrin (2,2-Dihydroxyindandion (1,3))	E. Merck, Darmstadt
Oleoyl-CoA	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Ouabain (Strophantin G)	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Palmitoyl-CoA	Sigma, St. Louis, U.S.A.
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Rinderserumalbumin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Rotiszint	C. Roth, Karlsruhe
Stearoyl-CoA	Sigma, St. Louis, U.S.A
Trichloressigsäure	C. Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma, St. Louis, U.S.A.

Radioaktive Substanzen:

Adenosin-5'-($-^{32}\text{P}$)triphosphat	Amersham-Buchler, Braunschweig
Lysophosphatidylcholin (^{14}C)	New England Nuclear, Boston, U.S.A.
Oleoyl-CoA (^{14}C)	New England Nuclear, Boston, U.S.A.

Enzyme:

γ -Glutamyltransferase-Kit	Boehringer, Mannheim
Cholesterin-Kit	Boehringer, Mannheim
Phospholipase A_2 (Aus Schlangengift)	Boehringer, Mannheim

Geräte:

Spektralphotometer	Zeiss PM 2 K Perkin Elmer Hitachi 200
Fluoreszenzspektral- photometer	Perkin Elmer MPF 4
Gaschromatograph	Varian Aerograph Series 1400
Integrator	3370 B Hewlett Packard
Ultrazentrifuge	Beckman, Modell L 3-50 Beckman, Modell L 2-65 B
Scintillationszähler	Tri-Carb Packard
Aufschlußgerät	Artisan Industry Inc.
Elektronenrechner	Wang 700

8. ABKÜRZUNGEN

Arach-CoA	Arachidonoyl-CoA
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
ConA	Concanavalin A
DPH	1,6-Diphenylhexatrien
DTNB	5,5'-Ditiobis-(2-Nitrobenzoesäure), Ellmanns Reagenz
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2- Äthansulfonsäure
Lyso-PC	Lysoposphatidylcholin (Lysolecithin)
Lyso-PE	Lyophosphatidyläthanolamin (Lysokephalin)
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PE	Phosphatidyläthanolamin (Kephalin)
PHA	Phytohämagglutinin
PPO	Diphenyloxazol
POPOP	Phenyloxazol-phenyl-oxazolylphenyl

LITERATUR

- Averdunk, R.; Lauf, P.K.; *Exp. Cell Res.* 93, (1975) 331
- Averdunk, R.; Müller, J.; Wenzel, B.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, (1976) 339
- Balzer, H.; Makinose, M.; Fiehn, W.; Hasselbach, W.; Naunyn-Schmiedebergs *Arch. Pharmak. Exp. Pathol.* 260, (1968) 456
- Barnett, R.E.; Scott, R.E.; Furcht, L.T.; Kersey, J.H.; *Nature* 249, (1974) 465
- Bloj, B.; Morero, R.D.; Farias, R.N.; Revel, E.; Trucco, R.E.; *Biochim. Biophys. Acta* 311, (1973) 67
- Bolstein, R.; *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 1957
- Brunner, G.; Bauer, H.C.; Suter, D.; Speth, V.; *Biochim Biophys. Acta* 507 (1978) 419
- Brunner, G.; Heidrich, H.G.; Golecki, J.R.; Bauer, H.C.; Suter, D.; Plückhahn, P.; Ferber, E.; *Biochim. Biophys. Acta* 471 (1977) 195
- Changeux, J.B.; in: *Cell Surface Development* (Moscana, A; ed.) Wiley, New York (1974)
- Coleman, R.; Hübscher, G.; *Biochim. Biophys. Acta* 73, (1963) 257
- Coleman, R.; *Biochim. Biophys. Acta* 30, (1973) 1
- Cooper, H.L.; in: *Immune Recognition* (ed. Rosenthal, A.S.) Academic Press, Inc. (1975)
- Cooper, R.A.; Leleie, M.H.; Fischkoff, S.; Shinitzky, M.; Shattil, S.J.; *Biochemistry* 17, (1978) 327
- De Kruyff, B.; de Greef, W.J.; van Eyk, R.V.W.; Demel, R.A.; van Deenen, L.L.M.; *Bochim. Biophys. Acat* 298, (1973) 479
- De Laat, S.W.; van der Saag, P.T.; Shinitzky, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, (1978) 4458
- De Robertis, R.R.; Zenser, T.V.; Adler, W.H.; Hudson, T.; *J. Immunol.* 113, (1974) 151
- Dornand, J.; Mani, J.C.; Mousseron-Canet, M.; Pau, B.; *Biochimie* 56, (1974) 1425

- Duttera, S.M.; Byrne, W.L.; Ganoza, M.C.; J. Biol. Chem. 243, (1968) 2216
- Ewell, R.H.; J. Appl. Phys. 9, (1937) 252
- Ey, P.L.; Ferber, E.; Biochim. Biophys. Acta 480, (1977) 403
- Ferber, E.; Resch, K.; Wallch, D.F.H.; Imm, W.; Biochim. Biophys. Acta 266, (1971) 494
- Ferber, E.; in: Biological Membranes Vol. 2., D. Chapman und D.F.H. Wallach (eds.), Academic Press, New York (1973) 221
- Ferber, E.; Reilly, C.; de Pasquale, G.; Resch, K.; in: Lymphocyte Recognition and Effector Mechanisms, Lindahl-Kiessling, K. und Osoba, D. (eds.) Academic Press, New York (1973) 529
- Ferber, E.; de Pasquale, G.; Resch, K.; Biochim. Biophys. Acta 398, (1975) 364
- Ferber, E.; Resch, K.; Naturwissenschaft 63, (1976) 375
- Ferber, E.; Blut 36, (1978) 255
- Ferber, E.; Kröner, E.; Schmidt, B.; Fischer, H.; Peskar, B.A.; Anders, C.; in: Membrane Fluidity, Biophysical Techniques and Cellular Regulations (Kates, M. and Kuksis, A. eds.) The Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1980), 239
- Ferraris, C.A.; de Robertis, F.R.; J. Clin. Invest. 54, (1974) 378
- Fiehn, W.; Hasselbach, W.; Eur. J. Biochem. 13, (1970) 510
- Fisher, D.B.; Mueller, G.C.; Biochim. Biophys. Acta 176, (1969) 316
- Fisher, D.B.; Mueller, G.C.; Biochim. Biophys. Acta 248, (1974) 434
- Fleischer, S.; Brierley, G.; Klouwen, H.; Slautterback, D.B.; J. Biol. Chem. 237, (1962) 3264
- Fleischer, B.; Casu, A.; Fleischer, S.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, (1966) 189
- Fleischer, S.; Fleischer, B.; in: Methods in Enzymology (Colowick, S.P.; Kaplan, N.O.; eds.) Vol. 10, Academic Press, New York (1967) 406
- Fourcans, B.; Jain, M.K.; in: Advances in Lipid Research (Paoletti, R.; Kritchevsky, D.; eds.) Vol. 12, Academic Press, New York (1964) 147
- Galo, M.G.; Bloj, B.; Farias, R.N.; J. Biol. Chem. 250 (1975) 6204

- Gerlach, E.; Deuticke, B.; *Biochem. Z.* 337, (1963) 477
- Goldemberg, A.L.; Farias, R.N.; Trucco, D.E.; *Biochim. Biophys. Acta* 291, (1973) 489
- Greeves, M.F.; Bauminger, S.; *Nature New Biology* 235, (1972) 67
- Gurr, M.I.; James, A.T.; *Lipid Biochemistry*, Chapman and Hall - London (1975)
- Johnson, S.M.; Robinson, R.; *Biochim. Biophys. Acta* 558, (1979) 282
- Jones, P.D.; Wakil, S.J.; *J. Biol. Chem.* 242, (1967) 5267
- Jurtshuk, P.; Sekuzu, I.; Green, D.E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, (1961) 76
- Kabat, E.A.; Mayer, M.M.; *Experimental Immunochemistry* (Thomas, C.C.; ed.) Springfield U.S.A. (1961) 526
- Kagawa, Y.; Racker, E.; *J. Biol. Chem.* 246, (1971) 5577
- Kaplan, J.G.; *TIBS* (1979) Juli
- Kelly, J.P.; Parker, C.W.; *J. Immunol.* 122, (1979) 1556
- Kelly, J.P.; Johnson, M.C.; Parker, C.W.; *J. Immunol.* 122, (1979) 1563
- Kimelberg, H.K.; *Biochim. Biophys. Acta* 413, (1975) 143
- Krishnaraj, R.; Talwar, G.P.; *J. Immunol.* 111, (1973) 1010
- Kundig, W.; Roseman, S.; *J. Biol. Chem.* 246, (1971) 1407
- Lands, W.E.M.; *J. Biol. Chem.* 235, (1960) 2233
- Lands, W.E.M.; Merkl, I.; *J. Biol. Chem.* 238, (1963) 898
- Lands, W.E.M.; Hardt, P.; *J. Biol. Chem.* 240, (1965) 1905
- Ling, N.R.; Kay, J.E.; *Lymphocyte Stimulation*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1975)
- Lowry, O.; Roseborough, N.; Farr, A.; Randall, R.; *J. Biol. Chem.* 193, (1951) 265
- McElhany, R.N.; de Gier, J.; van der Neut-kok, E.C.M.; *Biochim. Biophys. Acta* 298, (1973) 500
- Mendelsohn, J.; Skinner, S.A.; Kornfeld, S.; *J. Clin. Invest.* 50, (1971) 818
- Monti, J.A.; Sarraf, A.M.; Christian, S.T.; Saxholm, H.J.K.; *Archives Biochem. Biophys.* 193, (1979) 496

- Novogrodsky, A.; *Biochim. Biophys. Acta* 266, (1972) 343
- Owens, K.; Hughes, B.P.; *J. Lipid. Rs.* 11, (1970) 486
- Parker, C.W.; Stenson, W.F.; Huber, M.G.; Kelly, J.P.; *J. Immunol.* 122, (1979) 1572
- Perrin, I.; *J. Phys. Radium* 7, (1962) 390
- Persijn, J.P.; van der Slik, W.; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, (1967) 421
- Peters, J.H.; Hausen, P.; *Eur. J. Biochem.* 19, (1971a) 502
- Peters, J.H.; Hausen, P.; *Eur. J. Biochem.* 19, (1971b) 509
- Pommier, G.; Riepert, G.; Azoulay, E.; Depies, R.; *Biochim. Biophys. Acta* 389, (1975) 483
- Post, R.S.; Sen, A.K.; in: *Methods in Enzymology* (Clowick, S.P.; Kaplan, N.O.; eds.) Vol. 10, (1967) 762
- Quastel, M.R.; Kaplan, J.G.; *Nature* 219, (1968) 198
- Quastel, M.R.; Kaplan, J.G.; *Exp. Cell Res.* 63, (1970) 230
- Quastel, M.R.; Kaplan, J.G.; *Exp. Cell Res.* 94, (1975) 351
- Rand, R.P.; Pangborn, W.A.; Purdan, A.D.; Trinker, D.A.; *Can. J. Biochem.* 53, (1975) 189
- Racker, E.; *J. Biol. Chem.* 247, (1972) 8198
- Racker, E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, (1973) 224
- Razin, S.; *Biochim. Biophys. Acta* 265, (1972) 241
- Resch, K.; Ferber, E.; *Eur. J. Biochem.* 27, (1972) 153
- Resch, K.; Gelfund, E.W.; Hansen, K.; Ferber, E.; *Eur. J. Immunol.* 2, (1972) 598
- Röschlau, P.; *Z. Klin. Biochem.* 12, (1974) 403
- Robinson, J.D.; Flashner, M.S.; *Biochim. Biophys. Acta* 549, (1979) 145
- Roses, A.D.; Butterfield, D.A.; Appel, S.H.; Chestnut, D.B.; *Arch. Neurol.* 32, (1975) 535
- Rothfield, L.; Romeo, D.; in: *Structure and Function of Biological Membranes* (Rothfield, L.; ed.) Academic Press, New York (1971) 251
- Sandermann, H. jr.; *Biochim. Biophys. Acta* 515, (1978) 209

- Sartorelli, L.; Galzigna, L.; Rossi, C.R.; Gibson, D.M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, (1967) 90
- Szarpa, A.; Baldanare, J.; Inesi, E.; *J. Gen. Physiol.* 60, (1972) 735
- Schairer, H.U.; Overath, P.; *J. Mol. Biol.* 44, (1969) 209
- Segel, G.B.; Lichtman, M.A.; *J. Clin. Invest.* 58, (1976) 1358
- Sha'afi, R.I.; Rodan, S.B.; Hintz, R.L.; Fernandez, S.M.; Rodan, G.A.; *Nature* 254, (1975) 525
- Shinitzky, M.; Inbar, M.; *J. Mol. Biol.* 85, (1974) 603
- Shinitzky, M.; Barenholz, Y.; *J. Biol. Chem.* 249, (1974) 2652
- Shinitzky, M.; Barenholz, Y.; *Biochim. Biophys. Acta* 515, (1978) 367
- Singer, S.J.; Nicolson, G.L.; *Science* 175, (1972) 720
- Silbert, D.F.; Cronan, J.E.; Beacham, I.D.; Harder, M.E.; *Fed. Proc.* 33, (1974) 1725
- Swoboda, G.; Fritzsche, J.; Hasselbach, W.; *Eur. J. Biochem.* 95, (1975) 77
- Thompson, G.A.; in: *The Regulation of Membrane Lipid Metabolism* (1980) CRC Press, Inc., Boca LRaton, Florida
- Tobari, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, (1964) 50
- Träuble, H.; *Naturwissenschaften* 58, (1971) 277
- Triggle, D.J.; in: *Recent Progress in Surface Science* (Danielli, I.F.; Riddford, A.C.; Rosenberg, M.D.; eds.) Vol. 3, Academic Press, New York (1970) 273
- Van den Berg, K.; Betel, I.; *Cell Immunol.* 10, (1974) 319
- Wallach, H.D.F.; Kamat, V.B.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 52, (1964) 721
- Warren, G.B.; Toon, P.A.; Birdsall, N.I.M.; Lee, A.G.; Metcalf, J.C.; *Biochemistry* 13, (1974) 5501
- Ways, P.; Hanahan, D.J.; *J. Lipid Res.* 5, (1964) 318
- Weber, G.; *Adv. Prod. Chem.* 8, (1953) 415
- Weltzien, H.U.; Arnold, B.; Kalkhoff, H.G.; *Biochim. Biophys. Acta* 455, (1976) 56
- Wilson, G.; Fox, C.F.; *J. Mol. Biol.* 55, (1971) 49
- Whitney, R.B.; Sutherland, R.M.; *Cell. Immunol.* 5, (1972) 137

Whitney, R.B.; Sutherland, R.M.; J. Cell Physiol. 82, (1973) 9

Wright, P.; Quastel, M.R.; Kaplan, J.C.; Exp. Cell. Res. 79, (197) 87

Yamashita, S.; Racker, E.; J. Biol. Chem. 244, (1969) 1220

LEBENS LAUF

- | | |
|---------------------------------|---|
| 18.8.1951 | Geboren als Sohn des Heinz Ulrich Anders und seiner Ehefrau Thea, geb. Bergmann, in Lahr/Baden |
| 1958 - 1963 | Besuch der Volksschule in Lahr/Baden |
| 1963 - 1971 | Besuch des
Hohenstaufen-Gymnasiums (Göppingen)
Geislinger Gymnasiums (Geislingen)
Max-Planck-Gymnasiums (Lahr) |
| Juni 1971 | Reifeprüfung am Max-Planck-Gymnasium in Lahr/Baden |
| 1971 - 1977 | Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br. |
| Juni 1977 | Hauptexamen für Diplom-Chemiker an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br. |
| August 1977 -
September 1980 | Durchführung der vorliegenden Promotion am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br. |

